



SISTEMA DI ANALISI nDNA COLORZYME®

Per uso diagnostico in vitro
Per Uso Professionale

USO PREVISTO: analisi enzimatica indiretta degli anticorpi per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-nDNA nel siero umano. Il sistema di analisi deve essere utilizzato come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Anticorpo antinucleare (ANA) è un termine generico usato per descrivere gli anticorpi contro varie nucleoproteine cellulari. I primi studi su questi anticorpi, con l'uso di tecniche di immunofluorescenza, rivelarono alcune specificità proteiche nucleari selezionate (1). A causa dell'alta correlazione dell'ANA positivo con il lupus eritematoso sistemico (SLE), un ANA negativo fu principalmente escluso dalla patologia (2).

Sebbene anticorpi specifici del DNA continuino a dimostrare un'elevata correlazione della patologia con SLE (3), nell'ultimo decennio è stato scoperto un certo numero di macromolecole nucleari (4) e citoplasmatiche (5-7) associate ad altre patologie del tessuto connettivo (8-10). Poiché alcuni di questi anticorpi sembrano avere un significato diagnostico e/o prognostico nella sclerosi sistemica progressiva (11-12), nella malattia mista del tessuto connettivo (13-15), nella sindrome di Sjögren (16-17), nella polimiosite (18) e/o nell'artrite reumatoide (19), il test ANA è ora riconosciuto come uno strumento di screening generale per la malattia del tessuto connettivo (20).

I pazienti con SLE possono produrre anticorpi contro una serie di antigeni nucleari, tuttavia quelli diretti contro l'Sm (antigene Smith) e l'nDNA mostrano la più alta correlazione con la patologia (20). Gli anticorpi diretti contro l'Sm mostrano un pattern della colorazione a chiazze mentre quelli diretti contro nDNA in genere mostrano un pattern omogeneo della colorazione ANA. Sebbene siano presenti bassi livelli di anticorpi nDNA nel siero di pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiositi, lupus eritematoso discoide e malattia mista del tessuto connettivo (21), alti livelli di anticorpi anti-nDNA sono osservabili quasi esclusivamente nell'SLE. Si ritiene che gli anticorpi contro nDNA siano coinvolti nella patogenesi della maggior parte delle varianti dell'SLE quando depositati come immunocomplessi (22). Gli anticorpi anti-nDNA si presentano in titolo alto e, poiché si collegano all'attività della patologia (23), il loro rilevamento è importante nel trattamento di pazienti affetti da SLE.

L'immunofluorescenza indiretta si è rivelata un problema per alcuni laboratori, a causa delle ridotte dimensioni dell'organismo della *Crithidia luciliae*, a meno che non si usino strumentazioni ottiche e fluorescenti di alta qualità. A causa di ciò, e della necessità di ridurre i problemi di riproducibilità tra laboratori inerenti al microscopio a fluorescenza, è stato sviluppato il sistema di analisi nDNA Colorzyme® della Immuno Concepts.

L'anticorpo del siero, reattivo all'nDNA, viene rilevato attraverso la colorazione del cinetoplasto all'interno dell'organismo *Crithidia luciliae* (24). La *C. luciliae* è un parassita della mosca carnaria e non è patogena per gli esseri umani. Il cinetoplasto di questi emoflagellati fa parte del grande mitocondrio in cui è concentrato l'nDNA a forma di elica (24-25). A micrografia elettronica, il cinetoplasto appare come una struttura a forma di disco, leggermente concava contenente la cresta mitocondriale ed una massa di DNA fibroso (26). Il cinetoplasto si trova tra il nucleo situato al centro e il corpo basale del flagello. Poiché l'nDNA del cinetoplasto non contiene alcun DNA a filamento singolo (ssDNA), sono virtualmente eliminati contaminanti, potenziali problemi di reazioni falsamente positive del ssDNA che possono presentarsi con l'analisi radioimmunologica del DNA del timo dei bovini (25, 27-31).



PRINCIPIO DEL TEST

Il sistema di analisi nDNA Colorzyme® della Immuno Concepts utilizza la tecnica di analisi enzimatica indiretta degli anticorpi. I campioni del paziente sono incubati con substrato antigene per consentire lo specifico legame degli autoanticorpi all'nDNA del cinetoplasto. Se sono presenti anticorpi anti-nDNA, si forma un complesso stabile antigene-anticorpo. Dopo il lavaggio per rimuovere anticorpi non specificamente legati, il substrato è incubato con un anticorpo anti-umano coniugato con perossidasi di rafano. Quando i risultati sono positivi, avviene la formazione di un complesso stabile in tre parti composto dall'anticorpo etichettato come enzimatico legato all'anticorpo anti-nDNA umano che è legato all'antigene nDNA. Questo complesso può essere visualizzato incubando il vetrino in reagente colorato contenente un substrato enzimatico specifico. La reazione tra l'anticorpo etichettato come enzimatico e il substrato specifico dell'enzima dà come risultato una reazione colorata sul vetrino, visibile mediante normale microscopia ottica. Nei campioni positivi, il cinetoplasto mostrerà una colorazione blu scuro-viola all'interno degli organismi della *Crithidia luciliae*. Se il campione è negativo per nDNA, il cinetoplasto non mostrerà alcuna colorazione.

COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

Uso: tutti i componenti sono pronti per l'uso senza che siano necessarie la suddivisione in aliquote o la ricostituzione (eccetto il tampone PBS e il reagente colorato Colorzyme® che devono essere sciolti in acqua deionizzata o distillata prima dell'uso).

Conservazione: tutti i componenti possono essere conservati alla temperatura di 2-10°C. Dopo la ricostituzione, il tampone PBS deve essere conservato in contenitori con tappo a vite e conservato tra i 2-25°C. Dopo la ricostituzione, il reagente colorato Colorzyme® deve essere conservato in un contenitore chiuso a temperatura ambiente fino a 30 giorni. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme®.

Stabilità: tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

REAGENTI REATTIVI

Vetrini del substrato [SLIDE]: Vetrini per substrato nDNA che usano *Crithidia luciliae* stabilizzati direttamente sui pozzetti di analisi. L'esclusivo design a fossa del vetrino minimizza la contaminazione incrociata dei pozzetti durante l'analisi. La busta del vetrino viene riempita con un gas inerte non tossico che favorisce la stabilità delle cellule.

Controllo positivo [CONTROL|+]: numero di catalogo 3021. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per antigeni nDNA. Questo siero dimostra una reazione positiva a colorazione del cinetoplasto o del cinetoplasto e del nucleo, sul substrato *Crithidia luciliae* della Immuno Concepts.

Siero di controllo titolabile [TC]: numero di catalogo 3026. Fiala pronta per l'uso contenente 0,5 ml di siero di controllo umano positivo da trattare come campione del paziente, non diluito. Vedere l'etichetta della fiala per il valore del titolo.

Siero di controllo negativo [CONTROL|-]: numero di catalogo 3031. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano negativo. Il siero di controllo negativo non mostrerà alcuna specifica colorazione del cinetoplasto sul substrato *Crithidia luciliae* della Immuno Concepts.

Reagente anticorpo enzimatico [CONJ|HRP]: numero di catalogo 5009 (9,0 ml), 5075 (23,0 ml). Anti-IgG umane coniugate con HRP. Il reagente è pronto all'uso e si presenta in flaconi contagocce di precisione con 9,0 ml per ogni 10 vetrini in kit di analisi completi.

Reagente colorato [PWDR|CRP]: numero di catalogo 4066. Polvere di substrato enzimatico specifico dell'HRP, contenente 4-cloro-1-naftolo. Ogni confezione contiene polvere per preparare 150 ml di reagente colorato Colorzyme® autoattivante.

Preparazione: sciogliere il contenuto di una busta in un litro di acqua deionizzata o distillata. Mescolare bene fino al completo dissolvimento. Questo reagente colorato è stabile per 30 giorni a temperatura ambiente in un contenitore chiuso. Questo reagente colorato può essere riutilizzato fino a 30 giorni o fino a che non è visibile un cambiamento di colore o un precipitato. Torbidezza o opalescenza, senza alcun precipitato visibile al momento del riutilizzo, sono normali. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente Colorzyme®.

COMPONENTI NON REATTIVI

Tampone impregnato di polvere PBS **PWDR|PBS**: numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna busta contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. (Nei kit di analisi completi, viene fornita una busta di polvere tamponata per cinque vetrini).

Preparazione: sciogliere una bustina di polvere tamponata in un (1) litro di acqua deionizzata o distillata, coprire, e conservati tra i 2-25°C, per massimo quattro settimane o fino a che non compaiono segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

Mezzo di fissaggio semipermanente **SOLN|MM**: numero di catalogo 1111. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 5,0 ml di mezzo di fissaggio a base di glicerolo.

Vetrini coprioggetto **CVSLP**: numero di catalogo 1042. Ciascuna confezione contiene dieci vetrini coprioggetto 24 x 64 mm N. 1.

ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche per l'erogazione di volumi da 20-25 µl
Vaschette Coplin o capsule di colorazione dei vetrini
Flacone morbido o pipette di Pasteur
Pipette sierologiche
Contenitori da un litro con tappo a vite (per tampone PBS)
Contenitore chiuso per la conservazione del reagente colorato Colorzyme®
Acqua deionizzata o distillata
Provette per preparare le diluizioni dei sieri
Carta bibula o assorbente
Camera per incubazione
Guanti a perdere
Timer da laboratorio
Microscopio luminoso capace di ingrandimenti da 200X e 400X

PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana usati per la preparazione dei controlli per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con un metodo approvato dalla FDA. Nessun metodo di analisi è in grado di garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, virus dell'epatite C, virus dell'epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i sieri di controllo vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
4. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante. Il sodio azide può reagire nelle tubature di piombo o rame formando sali metallici di azide esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. Nel caso debbano essere usati sieri emolizzati o lipemici, per risultati ottimali, inattivare a caldo i sieri per 30 minuti a 56°C. Non usare sieri contaminati microbicamente.
7. Il siero di controllo titolabile è destinato ad essere usato nel monitoraggio da lotto a lotto e nella riproducibilità interfase. Non è destinato alla misurazione della sensibilità complessiva o della specificità del dosaggio.
8. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
9. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
10. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati falsi.

11. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
12. Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
13. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i vetrini e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
14. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
15. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
16. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.
17. Il reagente colorato può essere riutilizzato fino a 30 giorni o fino a che non è visibile un cambiamento di colore o un precipitato. Torbidezza o opalescenza, senza alcun precipitato visibile al momento del riutilizzo, sono normali. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme®.

RACCOLTA DI CAMPIONI

Raccolta: il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-25°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

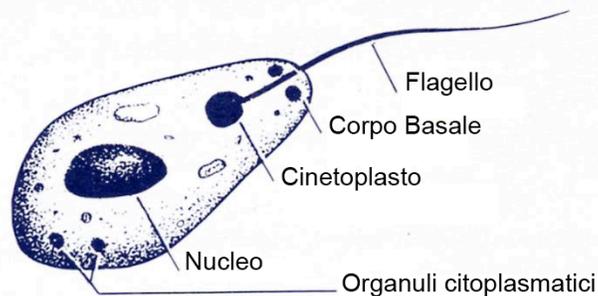
Sostanze interferenti: non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati falsi. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

Conservazione: i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in frigoriferi autosbrinatori o in freezer.

ATTENZIONE: il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATI

La giusta interpretazione dei risultati dipende da una chiara conoscenza delle varie caratteristiche morfologiche dell'organismo della *Crithidia luciliae*.



Il rivestimento esterno della maggior parte dei protozoi consiste di uno strato di pellicola composto di lipoproteina. All'interno della pellicola si trova la membrana plasmatica. La membrana plasmatica racchiude il citoplasma che è formato: a) da uno strato esterno di ectoplasma contenente il corpo basale e il flagello e b) dall'endoplasma, un citoplasma interno molto fluido contenente il nucleo, il cinetoplasto e altro organuli.

La pellicola, la membrana plasmatica, il corpo basale e il flagello sono in genere considerati impianti permanenti all'interno dell'organismo con poca variabilità di posizione da cellula a cellula. Sebbene il cinetoplasto sia generalmente situato più vicino al corpo basale che al nucleo, l'esatta posizione di questo organulo può variare da cellula a cellula a causa della natura fluida dell'endoplasma.

Per differenziare chiaramente il cinetoplasto dal nucleo, osservare la provetta di controllo positivo. Il cinetoplasto sarà sempre più vicino al flagello (come spiegato sopra). Il pozzetto del controllo negativo non mostrerà alcuna colorazione del cinetoplasto, mentre il pozzetto del controllo positivo mostrerà colorazione del cinetoplasto.

LEGGERE SOLO I SINGOLI ORGANISMI, BEN DEFINITI, IN CIASCUN CAMPO. LA MORFOLOGIA PUÒ VARIARE DA ORGANISMO A ORGANISMO A CAUSA DELLA FISSAZIONE DURANTE LA FASE DI CRESCITA.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

I controlli positivo, negativo e PBS devono essere analizzati nei pozzetti previsti per il controllo qualità su ciascun vetrino. Il controllo positivo dovrebbe mostrare una luminosa fluorescenza blu scuro-viola nel cinetoplasto della *Crithidia lucilliae*, con o senza colorazione del nucleo. Il controllo negativo non mostrerà alcuna colorazione del cinetoplasto. Il controllo PBS si usa per osservare la colorazione non specifica del reagente anticorpo, e non dovrebbe mostrare alcuna colorazione blu. Se i controlli non appaiono come descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

CONTROLLO TITOLABILE OPZIONALE

Nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 1:10. Il primo pozzetto in cui è visibile una colorazione chiaramente distinguibile del cinetoplasto è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

Il titolo medio e la gamma del titolo (\pm una diluizione duplice su ciascun lato della media) determinati per questo numero di lotto sono stati stabiliti nel nostro laboratorio e sono indicati come guida. Questo controllo è fornito per consentire a ciascun laboratorio di valutare la riproducibilità (di precisione) del proprio test nDNA. Dal momento che questo controllo non è destinato ad essere un indicatore dell'accuratezza del titolo, ciascun laboratorio deve stabilire il proprio punto medio di equivalenza della reazione per questo campione e deve usare tali informazioni per valutare la riproducibilità interfase (di precisione).

Attraverso analisi multiple di questo controllo titolabile, usando il sistema di analisi nDNA Colorzyme[®] della Immuno Concepts, è stato stabilito un valore medio del titolo per ciascun numero di lotto. Il numero di lotto, il titolo medio e la gamma del titolo (\pm una duplice diluizione su ciascun lato della media) sono indicati sull'etichetta della fiala e vanno usati come guida della performance del sistema di analisi.

I valori ottenuti nel nostro laboratorio possono essere diversi dai vostri. Di seguito sono indicati alcuni tra i fattori che possono influenzare i risultati.

1. Il giusto allineamento del percorso ottico del microscopio. Per istruzioni, consultare il manuale del proprio microscopio.
2. L'apertura numerica dell'obiettivo. L'apertura numerica è correlata alla capacità di captazione della luce ed alla risoluzione dell'obiettivo. L'apertura numerica è stampata sul lato dell'obiettivo.
3. La precisione e l'accuratezza della tecnica di diluizione, dell'apparecchiatura e della performance delle procedure di analisi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Per visualizzare la *Crithidia* si raccomanda un ingrandimento totale di 400X.

Negativo: un siero si considera negativo per gli anticorpi anti-nDNA se la colorazione del cinetoplasto è minore o uguale al pozzetto di controllo negativo. La colorazione nucleare, senza colorazione del cinetoplasto, si considera anch'essa negativa per gli anticorpi anti-nDNA.

Positivo: un siero si considera positivo se il cinetoplasto mostra una colorazione chiaramente distinguibile con colorazione maggiore rispetto al pozzetto di controllo negativo.

Titoli: nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 1:10. Il primo pozzetto in cui è visibile una colorazione chiaramente distinguibile del cinetoplasto è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

INTENSITÀ DELLA COLORAZIONE ENZIMATICA

Il grado di intensità della colorazione non ha valore clinico dimostrato e il suo valore si limita ad essere indicatore del titolo (32). Per semplificare l'interpretazione, registrare i risultati dello screening come fortemente positivi o positivi, e titolare di conseguenza.

Reazione fortemente positiva: colorazione blu-viola da scura a molto scura con profilo cellulare netto del cinetoplasto.

Reazione positiva: colorazione debole o sfocata blu-viola con maggiore variabilità di colorazione tra gli organismi. Il profilo cellulare può essere meno ben definito in alcuni organismi con una maggioranza di essi che ancora mostrano una colorazione chiaramente distinguibile del cinetoplasto.

RIPORTO DEI RISULTATI

Screening: i risultati devono essere riportati come fortemente positivi, positivi o negativi alla diluizione di 1:10.

Titoli: i risultati vanno riportati come ultima diluizione del siero in cui si vede una colorazione chiaramente distinguibile del cinetoplasto. Risultati con una forte reazione alla diluizione di 1:640 devono essere riportati come maggiori di 1:640.

CARATTERISTICHE DELLA COLORAZIONE

Cinetoplasto: colorazione omogenea o periferica del cinetoplasto vicino alla regione flagellare dell'organismo.

Risultato: positivo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: nDNA.

Associazione con patologie: titoli alti suggeriscono SLE attiva (20) o, in caso di SLE precedentemente diagnosticata, patologia ricorrente o mancata risposta alla terapia (21-23).

Nucleo: colorazione omogenea, periferica o a chiazze del nucleo.

Risultato: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni nucleari associati (21-23).

Associazione con patologie: la colorazione nucleare positiva può indicare una malattia non specifica del tessuto connettivo.

NOTA: risultati ANA positivi con HEp-2 o altri substrati, di norma non danno la corrispondente colorazione nucleare sulla *C. luciliae*, ad es. un ANA a chiazze con HEp-2 non mostra colorazione nucleare a chiazze su *C. luciliae*.

Corpi basali: una colorazione omogenea di due sfere situate laddove il corpo dell'organismo si collega al flagello nell'ectoplasma.

Sinonimi: corpi basali.

Risultati: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni associati al corpo basale.

Associazione con patologie: riportata in pazienti affetti da SLE che non mostrano colorazione del cinetoplasto o del nucleo (33).

Flagello: colorazione del flagello dell'organismo.

Sinonimi: regione finale dell'organismo.

Risultato: negativo per anticorpi anti-nDNA.

Antigeni: antigeni sconosciuti associati al flagello.

Associazione con patologie: sconosciuta.

LIMITI DEL TEST

1. Le diagnosi non possono essere fatte solo sulla base del rilevamento dell'anticorpo anti-nDNA. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi anti-nDNA. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Certi farmaci, tra cui la procainamide e la idralazina, possono indurre una patologia del tipo lupus eritematoso. Pazienti con LE da farmaci possono mostrare ANA positivi comunemente diretti contro gli istoni nucleari, sebbene sia stato riportato anche l'anticorpo anti nDNA (34-35).
4. Anche se un nDNA con titolo alto può essere fortemente indicativo di SLE, ciò non deve essere considerato come diagnostico ma esaminato piuttosto come parte della complessiva storia clinica del paziente. Bassi titoli di anticorpi anti-nDNA sono spesso presenti nel siero di pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiositi, lupus eritematoso discoide e malattia mista del tessuto connettivo (21).
5. Pazienti sottoposti a terapia con steroidi possono avere risultati negativi per l'anticorpo nDNA (36).

VALORI ATTESI

Il valore atteso nella popolazione normale è negativo in una diluizione di screening di 1:10. Certi farmaci, come la idralazina, possono indurre una produzione di anticorpi anti-nDNA (34-35).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

RILEVAMENTO

Il sistema di analisi nDNA Colorzyme® della Immuno Concepts è stato testato per l'equivalenza, con l'analisi nDNA ad immunofluorescenza indiretta della Immuno Concepts, attraverso lo screening e la titolazione di quarantanove campioni di siero rappresentanti i diversi autoanticorpi osservati nella febbre reumatica sistemica. I risultati con l'uso di enzimi avevano una correlazione del 100% con nDNA ad immunofluorescenza della Immuno Concepts per tutti i sieri analizzati (37).

Il sistema di analisi in fluorescenza nDNA della Immuno Concepts è stato valutato in confronto con altre analisi in fluorescenza degli anticorpi in distribuzione sul mercato (37). Per lo studio sono stati utilizzati 103 campioni di siero di individui normali e di pazienti con diagnosi comprendenti lupus eritematoso sistemico (SLE), malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), variante CREST della sclerosi sistemica progressiva di Raynaud (PSS-CREST), artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide giovanile (JRA) ed altre malattie del tessuto connettivo. I sieri sono stati testati alle diluizioni di screening raccomandate da ciascun produttore. Nella tabella 1 sono riassunti i risultati dello studio.

TABELLA 1

DIAGNOSI	Numero di pazienti	Immuno Concepts Positivi 1:10	Produttore A Positivi 1:10	Produttore B Positivi 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD/coincidenti	6	0	0	0
PSS-CREST di Raynaud	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Altre malattie del tessuto connettivo	9	0	0	0
Controlli ospedalizzati	11	1	1	1
Controlli normali	24	0	0	0

Il controllo ospedalizzato che era positivo tutte le analisi nDNA *Crithidia luciliae* aveva malattia renale da immunocomplessi non corrispondente ai criteri per la diagnosi di SLE.

PRECISIONE

Dieci sieri nDNA positivi furono titolati in duplicato in tre occasioni. In tutti i casi, tutti i titoli furono riprodotti con una diluizione più o meno duplice (37). Questi risultati sono in linea con gli standard di precisione per i reagenti di anticorpi fluorescenti stabiliti dai CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centri per il controllo e la prevenzione delle patologie) di Atlanta, Georgia.

RIFERIMENTI

1. Robbins, W. C., Holman, H. R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. J. Biol. Chem. 254:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.

14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, C. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
22. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 6:131-140, 1976.
23. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. *Clin. Exp. Immunol.* 22:9-15, 1975.
24. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. *J. Protozool.* 15:132-136, 1968.
25. Aarden, L. A., DeGroot, E. R., Feltkamp, T.E.W. Immunology of DNA. III *Crithidia luciliae*, a Simple Substrate for the Determination of Anti-dsDNA with the Immunofluorescent Technique. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254:505-515, 1975.
26. Laurent, M., van Assel, S., Steinert, M. Kinetoplast DNA. A Unique Macromolecular Structure of Considerable Size and Mechanical Resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:278-284, 1971.
27. Deegan, M. J., Walker, S. E., Lovell, S. E. Antibodies to Double Stranded DNA. A Comparison of the Indirect Immunofluorescent Test Using *Crithidia luciliae* and the DNA-Binding Assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 69:599-604, 1978.
28. Feltkamp, T. E.W., van Rossum, A. L. Antibodies to Salivary Duct Cells, and Other Autoantibodies, in Patients with Sjögren's Syndrome and Other Idiopathic Autoimmune Diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 3:1-16, 1968.
29. Murakami, W. T., van Vunakis, H., Grossman, L., et al. Immunochemical Studies of Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. II. Characterization of the Active Antigen. *Virology* 14:190-197, 1961.
30. Locker, J. D., Medof, M. E., Bennett, R. M., et al. Characterization of DNA Used to Assay Sera for Anti-DNA Antibodies; Determination of the Specificities of Anti-DNA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Non-SLE Rheumatic Disease States. *J. Immunol.* 118:694-701, 1977.
31. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. In: *Immunoassays in the Clinical Laboratory*. Ed. by Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S., pp. 317-338. Alan R. Liss, Inc., New York, NY. 1979.
32. Nakamura, R. M., Peebles, C. L., Molden, D. P.: et al. Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases, *Laboratory Med.* 15:190-198, 1984.
33. Vogel, J. C., Roberts, J. L., Lewis, E. J. A Non-Anti-DNA Antibody Detected With the *Crithidia luciliae* Anti-DNA Assay. *New Engl. J. Med.* 303:458-459, 1980.
34. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. *J. Rheum.* 2:215-220, 1975.
35. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. *J. Rheum.* 2:167-171, 1975.
36. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. *Arthritis Rheum.* 22:321-328, 1979.
37. Data on file. Immuno Concepts, Incorporated.

In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattare Immuno Concepts prima dell'uso.



Fornitore



Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea



Limitazione Di
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le
istruzioni per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 5000-I,

4.11.02.003.094-It

Rev 3.0 © Copyright 2014

PROCEDURA DI ANALISI IN NDNA COLORZYME®

NOTA: Se il laboratorio sta utilizzando un preparatore automatico di campioni, si devono seguire la procedura e le raccomandazioni del produttore del preparatore stesso. Il preparatore di vetrini dovrebbe essere programmato affinché la diluizione dei campioni, la dispensazione dei volumi e i tempi di incubazione siano appropriati come sottolineato di seguito.

- 1. RICOSTITUZIONE DEL TAMPONE (PBS)**
Sciogliere il contenuto di una busta di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Il tampone PBS può essere coperto e conservato a 2-25°C fino a quattro settimane.
- 2. RICOSTITUZIONE DEL REAGENTE COLORATO**
Sciogliere il contenuto di una busta in un litro di acqua deionizzata o distillata. Mescolare bene fino al completo dissolvimento. Questo reagente colorato è stabile per 30 giorni a temperatura ambiente in un contenitore chiuso. Questo reagente colorato può essere riutilizzato fino a 30 giorni o fino a che non è visibile un cambiamento di colore o un precipitato. Torbidezza o opalescenza, senza alcun precipitato visibile al momento del riutilizzo, sono normali. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme®.
- 3. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**
Screening: diluire i campioni dei pazienti a 1:10 aggiungendo 0,1 ml (100 µl) di siero a 0,9 ml di PBS ricostituito.
Titolo semi-quantitativo: per preparare diluizioni seriali duplici di campioni di screening (ad es. 1:20, 1:40, 1:80...1:640), rimuovere 0,5 ml della diluizione 1:10 e mescolarla con 0,5 ml di PBS per ottenere una diluizione a 1:20, e continuare le diluizioni seriali in tal modo.
- 4. DILUIZIONE OPZIONALE DEL CONTROLLO TITOLABILE**
Trattare il controllo opzionale titolabile come un campione del paziente non diluito. Diluire il controllo a 1:10 aggiungendo 0,1 ml (100 µl) di siero di controllo a 0,9 ml di PBS ricostituito. Preparare diluizioni seriali duplici del controllo titolabile, come sopra descritto.
- 5. PREPARAZIONE DEI VETRINI DEL SUBSTRATO (20-25 µl/pozzetto)**
Rimuovere il/i vetrino/i dal contenitore/i e porre i sieri di controllo sui pozzetti di controllo come descritto di seguito. Capovolgere il flacone contagocce di controllo e premere delicatamente fino a che in punta non è visibile la goccia. Appoggiare delicatamente la goccia sul pozzetto di controllo appropriato evitando il contatto diretto della punta del contagocce con la superficie del vetrino. Aggiungere 1 goccia (20-25 µl) di campione del paziente ai pozzetti numerati.
ATTENZIONE: IL CONTATTO DIRETTO DELLA PUNTA DEL CONTAGOCCE CON LA SUPERFICIE DEL VETRINO PUÒ DANNEGGIARE IL SUBSTRATO ANTIGENE.
- 6. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Mettere il/i vetrino/i in una camera umida, coperta (una capsula di Petri con carta assorbente inumidita andrà bene). Incubare, col coperchio, per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 7. RISCIAQUO COL PBS**
Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS usando una bottiglia a zampillo, una pipetta di Pasteur o una pipetta sierologica. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
NOTA: per evitare la contaminazione incrociata sui vetrini con 13 pozzetti, orientare il flusso di PBS lungo la linea mediana del vetrino, inclinandolo prima verso le provette 1-5 e poi verso quelle 6-10.
- 8. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**
Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Questo lavaggio può durare fino a 10-30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino. Eliminare la soluzione di lavaggio PBS dopo l'uso.
- 9. REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO (coprire i pozzetti con 10-12 gocce)**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata. Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Riportare immediatamente il vetrino nella camera di incubazione e coprire completamente i pozzetti usando il reagente anticorpo enzimatico; iniziare mettendo una goccia su ogni pozzetto. Ripetere l'operazione per ciascun vetrino. Il reagente anticorpo enzimatico è stato titolato al fine di compensare l'acqua deionizzata o distillata residua che resta sul vetrino dopo il risciacquo.
NOTA: è importante che i pozzetti dei vetrini non si asciugano durante questa procedura onde evitare il danneggiamento del substrato.
TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE LO STESSO NON RESTI SENZA REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO PER PIÙ DI 15 SECONDI.
- 10. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Mettere il coperchio sulla camera di incubazione. Lasciare incubare il/i vetrino/i per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 11. RISCIAQUO COL PBS**
Rimuovere il/i vetrino/i dalla camera di incubazione e sciacquare brevemente con PBS. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
- 12. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**
Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Questo lavaggio può durare fino a 10-30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino.
- 13. INCUBAZIONE DEL REAGENTE COLORATO (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata e tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o carta assorbente in modo da rimuovere l'acqua in eccesso. Mettere immediatamente il/i vetrino/i in una vaschetta Coplin contenente il reagente colorato attivato ed incubare per 30 minuti.
- 14. RISCIAQUO COL PBS**
Rimuovere un vetrino alla volta dalla vaschetta Coplin e sciacquare ciascun lato del vetrino per 4-5 secondi con PBS. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti. Mettere ciascun vetrino risciacquato con PBS in una vaschetta Coplin piena di acqua deionizzata o distillata fino a che tutti i vetrini sono stati tolti dal reagente colorato. Passare subito al punto 15.
- 15. MONTAGGIO DEL VETRINO COPRIOGGETTI**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS dall'acqua deionizzata o distillata e tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o carta assorbente in modo da rimuovere l'acqua in eccesso.
NON TAMPONARE O NON ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE RIMANGA SENZA COPRIVETRINO PER PIÙ DI 15 SECONDI. Aggiungere 4-5 gocce di mezzo di fissaggio semipermanente lungo la linea mediana di ciascun vetrino. Posizionare con attenzione il vetrino coprioggetto, evitando vuoti d'aria, abbassando delicatamente il vetrino coprioggetto da un estremo all'altro del vetrino.
NOTA: un eccesso di mezzo di fissaggio sul vetrino può avere come risultato la mancanza di risoluzione chiara delle cellule (immagine sfocata). L'eccesso del mezzo di fissaggio può essere eliminato dal vetrino tamponando delicatamente il vetrino coprioggetto con carta assorbente o carta per pulire lenti evitando qualsiasi movimento diretto del vetrino coprioggetto. I vetrini possono essere letti immediatamente oppure possono essere conservati per lungo tempo ad una temperatura di 2-10°C senza alcuna perdita di reattività.

PER ASSISTENZA TECNICA: +1-916-363-2649
oppure a mezzo e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com