



SISTEMA DE TESTE COLORZYME® PARA nDNA

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

USO PRETENDIDO: Este é um teste de anticorpo enzimático indireto para detecção semiquantitativa de anticorpo anti-nDNA em soro humano. Este sistema de teste destina-se ao uso como auxiliar no diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Anticorpo antinuclear (ANA) é um termo geral, usado para descrever autoanticorpos para várias proteínas nucleares das células. Estudos iniciais desses anticorpos, que empregaram técnicas de imunofluorescência, revelaram algumas especificidades selecionadas da proteína nuclear (1). Devido à alta correlação do ANA positivo com o lúpus eritematoso sistêmico (LES), o teste negativo para ANA essencialmente excluía a doença (2).

Embora os anticorpos específicos para DNA continuem a mostrar alta correlação com LES (3), na última década, várias das macromoléculas nucleares (4) e citoplasmáticas (5-7) também foram detectadas e associadas a outras doenças de tecido conectivo (8-10). Considerando que vários desses anticorpos parecem ter utilidade diagnóstica e/ou prognóstica em esclerose sistêmica progressiva (11-12), doença conjuntiva do tecido conectivo (13-15), síndrome de Sjögren (16-17), polimiosite (18) e artrite reumatoide (19), agora se reconhece que o teste de ANA é uma ferramenta de triagem geral para a doença do tecido conectivo (20).

Os pacientes com LES podem produzir anticorpos para uma variedade de antígenos nucleares, porém, os anticorpos direcionados contra Sm (antígeno Smith) e nDNA apresentam a maior correlação com a doença (20). Os anticorpos direcionados contra Sm demonstram padrão de coloração pontilhado de ANA, ao passo que os anticorpos direcionados contra nDNA, em geral, apresentam padrão de coloração homogênea de ANA. Embora os baixos níveis de anticorpos anti-nDNA sejam presença frequente no soro de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva, dermatomiosite, lúpus eritematoso discoide e doença mista do tecido conjuntivo (21), os altos níveis de anticorpos anti-nDNA são vistos quase exclusivamente no LES. Acredita-se que os anticorpos contra nDNA estão envolvidos na patogênese das variantes mais graves de LES, quando se depositam como complexos imunes (22). Os anticorpos anti-nDNA ocorrem em altos títulos e, como se correlacionam com a atividade da doença (23), sua detecção é importante no tratamento dos pacientes com LES.

Está comprovado que a imunofluorescência indireta é um problema para alguns laboratórios, devido ao pequeno tamanho do organismo *Crithidia luciliae*, a menos que se usem qualidade óptica e equipamento fluorescente excelentes. Por causa disso, e da necessidade de reduzir os problemas inerentes de reprodutibilidade entre laboratórios da microscopia de fluorescência, foi desenvolvido o Sistema de teste Colorzyme® para nDNA da Immuno Concepts.

O anticorpo sérico reativo para nDNA é detectado por coloração do cinetoplasto no interior do organismo *Crithidia luciliae* (24). *C. luciliae* é um parasita da mosca varejeira e não é patogênico para o ser humano. O cinetoplasto desses hemoflagelados é parte de uma grande mitocôndria na qual o nDNA helicoidal está concentrado (24-25). Na eletromicrografias, o cinetoplasto aparece como uma estrutura ligeiramente côncava, em forma de disco, que contém cristas mitocondriais e uma massa fibrosa de DNA (26). O cinetoplasto é encontrado entre o núcleo de localização central e o corpo basal do flagelo. Como o nDNA do cinetoplasto não contém contaminantes de DNA de cadeia única (ssDNA), os possíveis problemas de reações falso-positivas de ssDNA, que ocorrem no radioimunoensaio com DNA de timo de bezerro, são praticamente eliminados (25, 27-31).

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste Colorzyme® para nDNA da Immuno Concepts usa a técnica de anticorpo enzimático indireta. As amostras do paciente são incubadas com substrato antigênico para permitir a ligação específica de autoanticorpos ao nDNA do cinetoplasto. Se o nDNA estiver presente, forma-se um complexo antígeno-anticorpo estável. Depois de lavar para remover os anticorpos ligados de modo não-específico, o substrato é incubado com reagente para anticorpo anti-humano conjugado à *horseradish* peroxidase. Quando os resultados são positivos, ocorre a formação de um complexo estável de três partes, consistindo em anticorpo enzimático marcado ligado ao anti-DNA humano, que é ligado ao antígeno n-DNA. Esse complexo pode ser visualizado incubando-se a lâmina em reagente colorido que contenha um substrato específico para a enzima. A reação entre o anticorpo marcado com a enzima e o substrato específico para a enzima resulta em reação colorida na lâmina, visível no microscópio óptico padrão. Nas amostras positivas, o cinetoplasto apresenta coloração azul-violeta escuro no interior dos organismos *Crithidia luciliae*. Se a amostra for negativa para nDNA, o cinetoplasto não apresentará coloração.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Uso: Todos os componentes vêm prontos para uso, sem necessidade de compor alíquotas ou de reconstituição (exceto para o tampão PBS e reagente colorido Colorzyme®, que devem ser dissolvidos em água desionizada ou destilada antes do uso).

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. Depois da reconstituição, o reagente tampão PBS deve ser armazenado em recipientes com tampa de rosca e armazenar de 2 °C a 25 °C. Depois da reconstituição, o reagente colorido Colorzyme® deve ser armazenado em recipiente fechado e em temperatura ambiente por até 30 dias. Dependendo da frequência de uso, 150 ml de reagente colorido Colorzyme® podem ser usados em até 20 lâminas.

Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilize qualquer componente depois de sua data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Lâminas de substrato [SLIDE]: Lâminas de substrato de nDNA que usam *Crithidia luciliae* estabilizado diretamente nos poços de teste. O modelo único de lâmina com fossos minimiza a contaminação cruzada dos poços durante o teste. A bolsa da lâmina é cheia com um gás inerte não-tóxico que contribui para a estabilidade das células.

Controle positivo homogêneo [CONTROL+] : Nº de Catálogo 3021. Frasco dispensador pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano positivo de controle com anticorpo específico para antígenos nDNA. Esse soro apresenta reação de coloração positiva do cinetoplasto ou do cinetoplasto e núcleo no substrato de *Crithidia luciliae* da Immuno Concepts.

Soro de controle titulável [TC]: Nº de Catálogo 3026. Frasco pronto para usar que contém 0,5 ml de soro humano positivo de controle a ser tratado como amostra de paciente não-diluída. Ver o valor da titulação na etiqueta do frasco.

Soro de controle negativo [CONTROL-] : Nº de Catálogo 3031. Frasco pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano negativo de controle. O soro de controle negativo não mostra qualquer coloração específica do cinetoplasto no substrato de *Crithidia luciliae* da Immuno Concepts.

Reagente de anticorpo enzimático [CONJ|HRP]: Nº de Catálogo 5009 (9,0 ml), 5075 (23,0 ml). IgG anti-humana conjugada a horseradish peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para uso, em frascos dispensadores de 9,0 ml para cada 10 lâminas no kit completo de teste.

Reagente colorido [PWDR|CRP]: Nº de Catálogo 4066. Substrato enzimático em pó específico para HRP, contendo 4-cloro-1-naftol. Cada embalagem contém pó para preparar 150 ml de reagente colorido autoativado Colorzyme®.

Preparação: Dissolver o conteúdo de uma bolsa em 150 ml de água desionizada ou destilada. Misturar bem até que esteja completamente dissolvido. Esse reagente colorido é estável por 30 dias em temperatura ambiente em um recipiente fechado. Esse reagente colorido pode ser reutilizado por até 30 dias ou até que alguma mudança de cor ou precipitado sejam visíveis. A turvação ou opalescência, sem precipitados visíveis à reutilização é normal. Dependendo da frequência de uso, 150 ml de reagente Colorzyme® podem ser usados em até 20 lâminas.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Tampão PBS em pó **PWDR|PBS**: N° de Catálogo 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. (É fornecida uma bolsa de pó de tampão para cada cinco lâminas nos kits completos de teste.)

Preparação: Dissolver uma bolsa de pó de tampão em um litro de água desionizada ou destilada, tampar e armazenar entre de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis.

Meio de montagem semipermanente **SOLN|MM**: No. Catálogo 1111. Frasco pronto para usar que contém 5,0 ml de meio de montagem com base em glicerol.

Lamínulas **CVSLP**: N° de Catálogo 1042. Cada pacote contém dez lamínulas de 24 x 64 mm No. 1 de vidro.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetas volumétricas para dispensar volumes de 20 a 25 µl
Três jarras de Coplin ou placas de coloração de lâmina
Almotolia ou pipetas Pasteur
Pipetas sorológicas
Recipientes de um litro com tampa de rosca (para o tampão PBS)
Recipiente fechado para armazenar o reagente colorido Colorzyme®
Água desionizada e destilada
Tubos de ensaio para realizar diluições em série
Papel absorvente ou papel-toalha
Câmara para incubação
Luvas descartáveis
Temporizador de laboratório
Microscópio óptico padrão capaz de 200X e 400X de aumento

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados na preparação de controles para este produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os soros de controle devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas no nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
4. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
5. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
6. Em caso de se utilizar soro hemolisado ou lipêmico, aquecer o soro inativado por 30 minutos até 56 °C para obter resultados ideais. O soro contaminado por micróbios não deve ser usado.
7. O soro de controle titulável destina-se ao uso na monitoração da reprodutibilidade de cada lote e de cada execução. Não se destina como medidor da sensibilidade ou especificidade gerais do ensaio.
8. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
9. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
10. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados falsos.
11. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.

12. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.
13. Deixar todos os reagentes, lâminas e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar.
14. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
15. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
16. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida e quantidade abundante de água.
17. O reagente colorido pode ser reutilizado por até 30 dias ou até que alguma mudança de cor ou precipitado sejam visíveis. A turvação ou opalescência, sem precipitados visíveis à reutilização é normal. Dependendo da frequência de uso, 150 ml de reagente colorido Colorzyme® podem ser usados em até 20 lâminas.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostra preferida. Cerca de 5 ml de sangue total devem ser coletados de modo asséptico, por punção venosa com tubo de coleta estéril e a vácuo ou com outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para minimizar a hemólise.

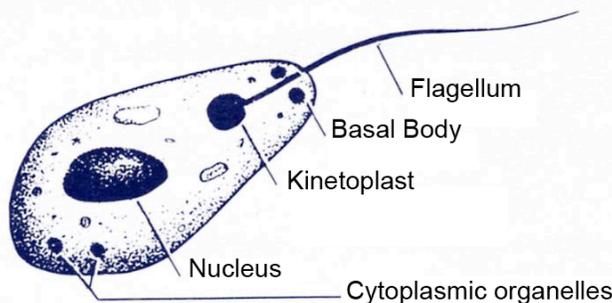
Substâncias interferentes: O soro que apresenta alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser usado porque essas condições podem ocasionar resultados aberrantes. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

Armazenamento: O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado congelado a -20 °C ou menos. O soro não deve ser armazenado em refrigerador ou freezer com autodescongelamento.

CUIDADO: O congelamento e descongelamento repetitivo das amostras dos pacientes pode gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A interpretação correta dos resultados depende do nítido reconhecimento das várias características morfológicas do organismo *Crithidia luciliae*.



A cobertura externa da maioria dos protozoários consiste em uma camada de película composta por lipoproteína. No interior da película, encontra-se a membrana plasmática. A membrana plasmática engloba o citoplasma que consiste de a) uma camada externa de ectoplasma, que contém o corpo basal e o flagelo e b) endoplasma, um citoplasma interno muito líquido que contém o núcleo, o cinetoplasto e outras organelas.

A película, a membrana plasmática, o corpo basal e o flagelo são, via de regra, considerados acessórios permanentes no interior do organismo, com pouca variabilidade na localização de uma célula para outra. Embora o cinetoplasto localize-se, em geral, mais perto do corpo basal do que do núcleo, a localização exata dessa organela pode variar de uma célula para outra, devido à natureza do líquido no endoplasma.

Para diferenciar claramente o cinetoplasto do núcleo, deve-se ver o poço de controle positivo. O cinetoplasto sempre será localizado mais próximo do flagelo (ilustrado acima). O poço de controle negativo não mostrará coloração do cinetoplasto, enquanto o poço de controle positivo mostrará sua coloração.

LER APENAS ORGANISMOS ISOLADOS, BEM-DEFINIDOS NO INTERIOR DE CADA CAMPO. A MORFOLOGIA PODE VARIAR DE UM ORGANISMO PARA OUTRO, DEVIDO À FIXAÇÃO DURANTE O CRESCIMENTO DA FASE DE REGISTRO.

CONTROLE DE QUALIDADE

Controles positivos, negativos e PBS devem ser executados nos poços destinados ao controle de qualidade em cada lâmina. O controle positivo deve mostrar coloração azul-violeta escuro no cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, com ou sem coloração do núcleo. O controle negativo não apresentará coloração do cinetoplasto. O controle PBS é usado para observar coloração não-específica do reagente de anticorpo, e não deve apresentar coloração azul. Se os controles não aparecerem conforme a descrição, o teste é inválido e deve ser repetido.

CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam a leitura no poço que contém a amostra mais diluída e leem "de trás para a frente" até a diluição de 1:10. O primeiro poço no qual um padrão claramente discernível é visível é o ponto final de titulação. Recomendamos esta técnica para determinar os pontos finais de titulação.

O título médio e a faixa de título (\pm uma diluição dupla em cada lado da média) determinados para este lote foram estabelecidos em nosso laboratório e são fixados como orientação. Esse controle é fornecido, para permitir que cada laboratório avalie a reprodutibilidade (precisão) de seus teste para nDNA. Desde que não se pretende que esse controle seja um indicador da exatidão do título, cada laboratório deve estabelecer seu próprio ponto final médio do título para essa amostra, e deve usar essa informação para avaliar reprodutibilidade de cada execução (precisão).

Por meio de múltiplos testes desse controle titulável, usando o Sistema de teste Colorzyme® para nDNA da Immuno Concepts, estabeleceu-se um valor de título médio para cada número de lote. O número de lote, o título médio e a faixa de título (\pm uma diluição dupla em cada lado da média) são declarados na etiqueta do frasco e devem ser usados como orientação no teste de desempenho do sistema.

Os valores obtidos em nosso laboratório podem diferir dos seus valores. Alguns dos muitos fatores que podem afetar seus resultados podem incluir o seguinte, sem a isso se limitar:

1. Alinhamento adequado da via de luz do microscópio. Consultar as instruções do manual do microscópio.
2. Abertura numérica da objetiva. A abertura numérica está relacionada com a capacidade de concentração de luz e com a resolução da objetiva. A abertura numérica está marcada ao lado da objetiva.
3. Precisão e exatidão da técnica de diluição, do equipamento e do desempenho dos procedimentos do teste.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

O aumento total de 400X é recomendado para visualizar *Crithidia*.

Negativo: Um soro é considerado negativo para anticorpos anti-nDNA se a coloração do cinetoplasto for menor ou igual à do poço de controle negativo. A coloração nuclear, sem coloração do cinetoplasto, também é considerada negativa para anticorpos anti-nDNA.

Positivo: Um soro é considerado positivo se o cinetoplasto apresentar coloração claramente discernível maior do que a do controle negativo.

Títulos: Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam a leitura no poço que contém a amostra mais diluída e leem "de trás para a frente" até a diluição de 1:10. O primeiro poço no qual um padrão claramente discernível é visível é o ponto final de titulação. Recomendamos esta técnica para determinar os pontos finais de titulação.

INTENSIDADE DA COLORAÇÃO ENZIMÁTICA

A intensidade da coloração não tem valor clínico comprovado e tem valor apenas limitado como indicador de título (32). Para simplificar a interpretação, registrar os resultados da seleção como fortemente positivos ou negativos e o título correspondente.

Reação fortemente positiva: Coloração azul-violeta escuro a muito escuro, com delineamento nítido do cinetoplasto.

Reação positiva: Reação positiva: Coloração azul-violeta esmaecido ou pouco intenso com maior variabilidade de coloração entre organismos. O delineamento celular pode ser menos bem-definido em certos organismos, sendo que a maioria ainda apresenta padrão de coloração claramente distinguível do cinetoplasto.

LAUDO DE RESULTADOS

Seleção: Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos na diluição de 1:10.

Titulação: Os resultados devem ser relatados como a última diluição em série em que a coloração claramente distinguível do cinetoplasto é observada. Os resultados com uma forte reação na diluição de 1:640 deve ser relatado como superior a 1:640.

CARACTERÍSTICAS DA COLORAÇÃO

Cinetoplasto: Coloração leve ou periférica do cinetoplasto perto da região do flagelo do organismo.

Resultado: Positivo para anticorpos anti-nDNA.

Antígenos: nDNA.

Associação com doenças: Os títulos altos são sugestivos de LES (20) ou, no caso de LES já diagnosticado, de doença recidivante ou ainda, de falta de resposta à terapia (21-23).

Núcleo: Coloração leve, periférica ou pontilhada do núcleo.

Resultado: Negativo para anticorpos anti-nDNA.

Antígenos: Antígenos nucleares associados (21-23).

Associação com doenças: A doença não-específica do tecido conectivo pode ser indicada pela coloração nuclear positiva.

NOTA: Os resultados positivos para ANA por HEp-2 ou outros substratos não apresentam normalmente a coloração nuclear correspondente em *C. luciliae*, por exemplo, o teste de ANA pontilhado por HEp-2 não apresenta coloração nuclear pontilhada em *C. luciliae*.

Corpos basais: Coloração leve de duas esferas localizadas onde o corpo do organismo se liga ao flagelo no ectoplasma.

Sinônimos: Cinetossomo.

Resultados: Negativo para anticorpos anti-nDNA.

Antígenos: Antígenos associados ao corpo basal.

Associação com doenças: Relatados nos pacientes com LES que não apresentam coloração do cinetoplasto ou do núcleo (33).

Flagelo: Coloração do flagelo do organismo.

Sinônimos: Região da cauda do organismo.

Resultado: Negativo para anticorpos anti-nDNA.

Antígenos: Antígenos associados ao flagelo desconhecidos.

Associação com doenças: Desconhecida.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpos anti-DNA. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos e do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos anti-nDNA. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Certas medicações, inclusive procainamida e hidralazina, podem induzir doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico. Os pacientes com LE induzido por medicação podem ser positivos para ANAs comumente direcionados contra as histonas nucleares, embora o anticorpo anti-nDNA também tenha sido relatado (34-35).
4. Embora o nDNA de alto título possa ser bastante sugestivo de LES, não se pode considerá-lo diagnóstico, mas sim, visto como parte da história clínica geral de um paciente. Os baixos títulos de anticorpos anti-nDNA em geral estão presentes no soro de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva, dermatomiosite, lúpus eritematoso sistêmico e doença mista do tecido conectivo (21).
5. Os pacientes que recebem tratamento com esteroides podem ter resultados negativos para anticorpo anti-nDNA (36).

VALORES ESPERADOS

O valor esperado na população normal é negativo na diluição de seleção de 1:10. Certos medicamentos, como hidralazina, podem induzir produção de anticorpo anti-nDNA (34-35).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

DETECÇÃO

O Sistema de teste Colorzyme[®] para nDNA da Immuno Concepts foi testado quanto à equivalência com o teste de nDNA por imunofluorescência indireta da Immuno Concepts por seleção e titulação de quarenta e nove amostras de soro que representam a diversidade de autoanticorpos encontrados na doença reumática sistêmica. Os resultados enzimáticos correlacionam-se 100% com o nDNA imunofluorescente para todos os soros testados (37).

O sistema de teste imunofluorescente da Immuno Concepts para nDNA foi avaliado anteriormente em comparação com outros testes imunofluorescentes para anticorpos já comercializados (37). O estudo empregou 103 amostras de soro de indivíduos normais e de pacientes com diagnósticos que incluíram lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença mista do tecido conectivo (DMTC), variante de CREST para síndrome de Raynaud-esclerose sistêmica progressiva (ESP-CREST), artrite reumatoide (AR), artrite reumatoide juvenil (ARJ), além de outras doenças do tecido conectivo. As amostras de soro foram testadas nas diluições de seleção recomendadas por cada fabricante. Os resultados do estudo estão resumidos na Tabela 1.

TABELA 1.

DIAGNÓSTICO	Número de pacientes	Positivo 1:10 da Immuno Concepts	Positivo 1:10 do Fabricante A	Positivo 1:10 do Fabricante B
LES	30	13	13	11
DMTC/sobreposição	6	0	0	0
ESP-CREST Raynaud	17	0	0	0
AR	2	0	0	0
ARJ	4	0	0	0
Outra doença do tecido conectivo	9	0	0	0
Controles hospitalizados	11	1	1	1
Controles normais	24	0	0	0

Os controles hospitalizados, positivos em todos os testes de nDNA de *Crithidia luciliae*, tinham doença renal por imunocomplexo, que não satisfaz os critérios de diagnóstico de LES.

PRECISÃO

Dez soros positivos para nDNA foram duplamente titulados em três ocasiões. Em todos os casos, todos os títulos foram reproduzidos na margem de mais ou menos duas diluições (37). Esses resultados são coerentes com os padrões de precisão para reagentes para anticorpo fluorescente dos Centers for Disease Control, Atlanta, Geórgia, EUA.

BIBLIOGRAFIA

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, Pt.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. Dados em arquivo da Immuno Concepts, Incorporated.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 5000-I,

4.11.02.003.094-Pt

Rev 3.0 © Copyright 2014

PROCEDIMENTO DO TESTE COLORZYME® PARA NDNA

NOTA: Se o laboratório está usando um sistema de processamento automatizado de amostras, os procedimentos e recomendações do fabricante do sistema devem ser seguidos. O sistema de processamento de lâminas deve ser programado para diluição apropriada das amostras, dispensação de volumes e tempos de incubação, conforme descrito abaixo.

1. RECONSTITUIÇÃO DE TAMPÃO (PBS)

Dissolver o conteúdo de uma bolsa de tampão em um litro de água desionizada ou destilada. O tampão PBS pode ser tampado e armazenado de 2°C a 25°C por até quatro semanas.

2. RECONSTITUIÇÃO DO REAGENTE COLORIDO

Dissolver o conteúdo de uma bolsa em 150 ml de água desionizada ou destilada. Misturar bem até que esteja completamente dissolvido. Esse reagente colorido é estável por 30 dias em temperatura ambiente em um recipiente fechado. Esse reagente colorido pode ser reutilizado por até 30 dias ou até que alguma mudança de cor ou precipitado sejam visíveis. A turvação ou opalescência, sem precipitados visíveis à reutilização é normal. Dependendo da frequência de uso, 150 ml de reagente colorido Colorzyme® podem ser usados em até 20 lâminas.

3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE

Seleção: Diluir as amostras do paciente até 1:10, adicionando 0,1 ml (100 µl) de soro a 0,9 ml de PBS reconstituído. Titulação semiquantitativa: Para fazer duas diluições em série das amostras selecionadas (por exemplo, 1:20, 1:40, 1:80...1:640), remover 0,5 ml da diluição de 1:10 e misturar com 0,5 ml de diluente da amostra para atingir a diluição de 1:20, e continuar as diluições em série dessa maneira.

4. DILUIÇÃO DE CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

Tratar o controle titulável opcional como uma amostra de paciente não diluída. Diluir o controle até 1:10 adicionando 0,1 ml (100 µl) do soro de controle a 0,9 ml do Diluente da amostra. Fazer duas diluições em série do controle titulável conforme descrição acima.

5. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS COM SUBSTRATO (20-25 µl/poço)

Remover a(s) lâmina(s) da bolsa e colocar soro de controle nos poços de controle, da seguinte maneira: Inverter o frasco dispensador de controle e comprimi-lo suavemente até que uma gota fique visível na ponta. Deixar a gota tocar suavemente no poço de controle apropriado, evitando o contato direto da ponta do dispensador com a superfície da lâmina. Adicionar 1 gota (20-25 µl) da amostra do paciente aos poços numerados.

CUIDADO: O CONTATO DIRETO DO DISPENSADOR COM A SUPERFÍCIE DA LÂMINA PODE RESULTAR EM DANO NO SUBSTRATO DE ANTÍGENO.

6. INCUBAR LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18°C a 25°C)

Colocar a(s) lâmina(s) em uma câmara úmida coberta (placa de Petri com papel-toalha umedecido é adequada). Incubar, com a tampa no lugar, por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18°C a 25°C).

7. ENXÁGUE COM PBS

Remover a(s) lâmina(s) da bandeja de incubação e enxaguar com PBS, usando almotolia, pipetas Pasteur ou pipeta sorológica. Não borrifar o tampão diretamente nos poços.

NOTA: Para evitar a contaminação cruzada nas lâminas, direcione o jato de PBS ao longo da linha média da lâmina, inclinando primeiro a fileira superior dos poços para a frente, e depois, inclinando a fileira inferior dos poços.

8. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)

Lavar a(s) lâmina(s) por 10 minutos com PBS em placa de coloração de lâmina ou jarra de Coplin. Essa lavagem pode estender-se por 10 a 30 minutos, sem ocasionar variabilidade nos resultados finais do teste. Descartar a solução de lavado do PBS depois do uso.

9. REAGENTE DE ANTICORPO ENZIMÁTICO (Cobrir os poços com 12 a 14 gotas)

Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada. Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. Devolver a lâmina imediatamente para a câmara de incubação e cobrir os poços completamente, usando reagente de anticorpo enzimático; começar colocando uma gota sobre cada poço. Repetir para cada lâmina. O reagente de anticorpo enzimático foi titulado para compensar o resíduo de água desionizada ou destilada na lâmina depois do enxágue.

NOTA: É importante que os poços de lâminas não sequem durante esse procedimento e que não ocorra dano ao substrato.

NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE FORMA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM REAGENTE DE ANTICORPO ENZIMÁTICO POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.

10. INCUBAR LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18°C a 25°C)

Colocar tampa na câmara de incubação e deixar a(s) lâmina(s) incubar(rem) 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18°C a 25°C).

11. ENXÁGUE COM PBS

Remover a(s) lâmina(s) da bandeja de incubação e enxaguar rapidamente com PBS. Não borrifar o tampão diretamente nos poços.

12. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)

Lavar a(s) lâmina(s) por 10 minutos com PBS em placa de coloração de lâmina ou jarra de Coplin. Essa lavagem pode estender-se por 10 a 30 minutos, sem ocasionar variabilidade nos resultados finais do teste.

13. INCUBAÇÃO DE REAGENTE COLORIDO (30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18°C a 25°C)

Remover uma lâmina por vez do PBS, mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. Colocar a(s) lâmina(s) imediatamente em uma jarra de Coplin que contenha reagente colorido ativado e incubar por 30 minutos.

14. ENXÁGUE COM PBS

Remover uma lâmina por vez da jarra de Coplin e enxaguar cada lado da lâmina por 4 a 5 segundos com PBS. Não borrifar o tampão diretamente nos poços. Colocar cada lâmina enxaguada com PBS na jarra de Coplin cheia com água desionizada ou destilada até que todas as lâminas tenham sido removidas do reagente colorido. Realizar imediatamente o procedimento 15.

15. COLOCAÇÃO DA LAMÍNULA

Remover uma lâmina por vez da água desionizada ou destilada e bater em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. **NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE FORMA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM LAMÍNULA POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.** Adicionar 4 a 5 gotas de meio de montagem semipermanente ao longo da linha média de cada lâmina. Colocar a lamínula cuidadosamente na posição, evitando bolsas de ar, abaixando suavemente a lamínula de uma extremidade da lâmina para a outra.

NOTA: O excesso de meio de montagem na lâmina pode resultar em falta de boa resolução das células (imagem borrada). O excesso de meio de montagem deve ser removido suavemente colocando-se a lamínula em papel absorvente enquanto se evita qualquer movimento direto. As lâminas podem ser lidas imediatamente ou armazenado por tempo prolongado de 2°C a 10°C sem perda de reatividade.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

