



FLUORESCERANDE nDNA TEST SYSTEM

För diagnostisk användning in vitro
För yrkesmässigt bruk

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett indirekt fluorescerande antikroppstest för halvkvantitativ detektion av anti-nDNA antikropp i humanserum. Detta testsystem skall användas som ett hjälpmedel vid diagnostisering av systemisk lupus erytematosus.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Antinukleär antikropp (ANA) är en allmän term som används för att beskriva autoantikroppar mot olika cellnukleära proteiner. Tidiga studier av dessa autoantikroppar med hjälp av immunofluorescerande teknik uppvisar ett litet antal nukleärproteinspecificiteter (1). Tack vare det höga sambandet mellan positiv ANA med systemisk lupus erytematosus (SLE) utesluter negativ ANA i huvudsak sjukdomen (2).

Även om DNA-specifika antikroppar fortfarande har ett högt sjukdomssamband med SLE (3), har under senare år ett antal nukleära (4) och cytoplasmiska (5-7) makromolekyler upptäckts och associerats med andra bindvävssjukdomar (8-10). Eftersom vissa av dessa antikroppar ser ut att kunna användas i diagnostiskt och/eller prognostiskt syfte vid progressiv systemisk skleros (11-12), blandad bindvävssjukdom (13-15), Sjögrens syndrom (16-17), polymyosit (18) och reumatoid artrit (19), har ANA-testning nu erkänts som ett allmänt screeningredskap för bindvävssjukdom (20).

SLE-patienter kan producera antikroppar mot flera olika nukleära antigener, men antikroppar som är riktade mot Sm (Smith-antigen) och nDNA uppvisar det högsta sambandet med sjukdomen (20). Antikroppar riktade mot Sm uppvisar ett fläckigt ANA-färgningsmönster, medan antikroppar riktade mot nDNA i allmänhet uppvisar ett homogent ANA-färgningsmönster. Även om patienter med reumatoid artrit, Sjögrens sjukdom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävssjukdom (21) kan ha låga nDNA-antikroppnivåer, är höga nDNA-antikroppnivåer så gott som uteslutande fallet vid SLE. Antikroppar mot nDNA tros ha ett samband med patogenesen vid de flesta svåra varianter av SLE, när dessa avsätter sig som immunkomplex (22). Antikroppar mot nDNA förekommer i höga antikroppnivåer, och eftersom de är associerade med sjukdomens aktivitet (23) är det viktigt att de upptäcks för behandlingen av SLE-patienterna.

Flera analyser finns tillgängliga för detektion av nDNA-antikroppar. Följande metoder används mest: Indirekt immunfluorescens, radioimmunanalys, kontraimmunelektrofores samt immundiffusion (24-27). Immuno Concepts nDNA-testsystem är en indirekt fluorescerande antikropp (IFA)-metod. Serumantikropp, reaktiv mot nDNA, detekteras genom färgning av kinetoplasten inuti organismen *Crithidia luciliae* (34). *C. luciliae* är en parasit på spyflugan och inte patogen för människor. Dessa hemoflagellaters kinetoplast är en del av den stora mitokondrie, i vilken det spiralformade nDNA:et är koncentrerat (33-34). På elektronmikrografier syns kinetoplasten som en något konkav skivformad struktur innehållande mitokondrisk crista och en fibrös DNA-massa (35). Kinetoplasten är belägen mellan den centralt placerade kärnan och flagellens basala knut. Eftersom kinetoplast-nDNA inte innehåller några enfibriga DNA (ssDNA)-smittämnen, går det praktiskt taget att utesluta eventuella problem med falskt positiva reaktioner på ssDNA, vilket kan förekomma med DNA-radioimmunanalys på kalvbräss (28-33).

TESTPRINCIP

Immuno Concepts nDNA-test använder den indirekta fluorescerande antikroppsteknik som först beskrivits av Weller och Coons (36). Patientprov odlas med antigensubstrat för att tillåta specifik bindning av autoantikroppar till kinetoplast-nDNA. Om det förekommer nDNA-antikroppar bildas ett stabilt antigen/antikroppkomplex. Efter tvättning för att avlägsna ospecifika antikroppar odlas substratet med en antihuman antikroppreagens konjugerad med fluorescein. Om resultatet är positivt bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en fluorescerande antikropp bunden till en human anti-nDNA-antikropp, som i sin tur är bunden till en nDNA-antigen. Detta komplex kan studeras i ett fluorescerande mikroskop. I positiva prover uppvisar kinetoplasten eller kinetoplasten och kärnan en klar äppelgrön fluorescens inuti organismerna *Crithidia luciliae*. Om provet är nDNA-negativt uppvisar kinetoplasten ingen fluorescens.

SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM MEDFÖLJER

Användning: Alla komponenter levereras bruksfärdiga utan krav på delning eller rekonstitution (förutom PBS-bufferten som måste lösas upp i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

Förvaring: Alla komponenter kan kylförvaras i 2-10°C. Efter rekonstitution skall PBS-bufferten förvaras i skruvlockbehållare och lagras mellan 2-25°C.

Stabilitet: Alla komponenter är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd ingen komponent efter dess utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

Objektglas för substrat [SLIDE]: nDNA-substratobjektglas med *Crithidia luciliae* stabiliserade direkt på testbrunnarna. Ett unikt vallgravsformat objektglas minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspåsen är fylld med en stabil giftfri gas som bidrar till cellernas stabilitet.

Positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 3021. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp specifik för nDNA-antigener. Detta serum uppvisar en ljus positiv färgningsreaktion på kinetoplasten på Immuno Concepts *Crithidia luciliae*-substrat.

Titrerbart kontrollserum [TC]: Katalognr 3026. Bruksfärdig ampull innehållande 0,5 ml positivt humankontrollserum som skall behandlas som ett utspätt patientprov. Se ampullens etikett för uppgift om antikroppnivå.

Negativt kontrollserum [CONTROL|-]: Katalognr 3031. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml negativt humankontrollserum. Det negativa kontrollserumet uppvisar ingen specifik färgning av kinetoplasten i Immuno Concepts *Crithidia luciliae*-substrat.

Fluorescerande antikroppreagens [CONJ|FITC]: Katalognr 3009 (9,0 ml), 3075 (23 ml). Antihuman IgG (tunga och lätta kedjor) konjugerade med fluorescein isotiocyanat (FITC). Reagensen levereras bruksfärdig i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart tionde objektglas i kompletta testsatser.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

PBS buffertpulver [PWDR|PBS]: Katalognr 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0.2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge 1 liter. (En påse med buffertpulver levereras för vart femte objektglas i kompletta testsatser).

Framställning: Sönderdela en påse buffertpulver i 1 liter avjoniserat eller destillerat vatten, täck och lagra mellan 2-25° C i upp till fyra veckor, eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar.

Halvpermanent monteringsmedel [SOLN|MM]: Katalognr 1111. Bruksfärdig pipettampull innehållande 5,0 ml glycerolbaserat monteringsmedel.

Skyddsremсор [CVSLP]: Katalognr 1042. Varje bunt innehåller tio 24 x 64 mm skyddsremсор nr 1 av glas.

YTTERLIGARE MATERIAL SOM BEHÖVS - MEDFÖLJER EJ

Volymetriska pipetter för pipettering av 20-25 µl volymer
Coplin-kärl eller färgningsskålar
Klämflaska eller Pasteur-pipetter
Serologiska pipetter
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att framställa serumspädningar
Läskpapper eller pappershanddukar
Engångshandskar
Enliters skruvlockbehållare (för PBS-buffert)
Laborietidur
Fluorescerande mikroskop med 495 nm matarfilter och 515 nm spärrfilter

FÖRSIKTIGHET

1. Allt material av humant ursprung som använts för att förbereda kontroller för denna produkt har testats med en FDA-godkänd metod och visat sig vara negativt (inte upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunbristvirus-1, humant immunbristvirus-2 (HIV-1 och HIV-2), hepatit C-virus (HCV) samt hepatit B ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan helt och hållet garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit C-virus, hepatit B-virus eller andra smittämnen. Därför skall all kontrollsera hanteras som potentiellt smittsamt material.
2. Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för eventuellt smittsamt humanserum eller blodprov i manualen från Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsostitut: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
4. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparledningar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras skall man därför spola med stora mängder kranvatten för att avlägsna eventuella rester i rörsystemen. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
6. Om hemolyserat eller lipemiskt sera måste användas, skall inaktivt sera värmas i 30 minuter i 56°C för att uppnå optimala resultat. Mikrobiellt kontaminerat sera skall inte användas.
7. Det titrerbara kontrollserumet är avsett att användas för att övervaka reproducerbarheten mellan olika loter eller serier. Det är inte avsett för mätning av den totala sensitiviteten eller analysens specificitet.
8. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
9. Undvik alltid stänk eller alstring av aerosoler.
10. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan orsaka felaktiga resultat.
11. Korskontamination mellan reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
12. Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel före användning. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
13. Placera alla reagenser, objektglas och prov i rumstemperatur (18-25°C) före användning.
14. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
15. Mikrobisk kontamination av reagenser eller prov kan ge felaktiga resultat.
16. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om kontakt ändå inträffat.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-25°C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler genom centrifugering för att minimera hemolys.

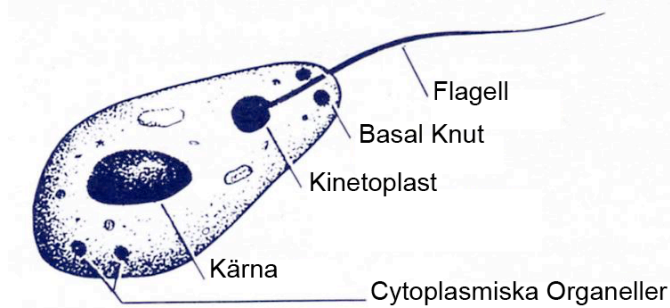
Störande substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi, eller mikrobiell tillväxt bör inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till felaktiga resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före testning.

Förvaring: Sera kan förvaras i 2-10°C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare skall sera frysas i -20°C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerum.

WARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge felaktigt positiva eller negativa resultat.

TOLKNING AV RESULTAT

Korrekt tolkning av resultatet beror på om det var enkelt att känna igen *Crithidia luciliae*-organismens olika morfologiska kännetecknen.



Det yttre höljet på de flesta protozoer består av en tunn hinna av lipoprotein. Plasmamembranet ligger inuti denna tunna hinna. Plasmamembranet omsluter cytoplasman bestående av a) ett yttre ektoplasmlager som omfattar basal knut och flagell och b) endoplasman, en mycket flytande inre cytoplasma som omfattar kärnan, kinetoplasten och andra organeller.

Den tunna hinnan, plasmamembranet, den basala knuten och flagellen ses i allmänhet som fasta fixurer inuti organismen, med liten variabilitet i placering från cell till cell. Även om kinetoplasten i allmänhet är belägen närmare den basala knuten än kärnan, kan den exakta placeringen av denna organell variera från cell till cell beroende på endoplasmas flytande konsistens.

Granska den positiva kontrollbrunnen för att klart särskilja kinetoplasten från kärnan. Kinetoplasten är alltid belägen närmare flagellen (se bild ovan). Till skillnad från den positiva kontrollen uppvisar den negativa kontrollbrunnen ingen kinetoplastfärgning.

STUDERA ENDAST ENSKILDA, VÄLDEFINIERADE ORGANISMER INOM VARJE FÄLT. MORFOLOGIN KAN VARIERA FRÅN ORGANISM TILL ORGANISM PÅ GRUND AV FIXERING UNDER LOGGFASENS GRADVISA TILLVÄXT.

KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och PBS-kontroller bör köras i de brunnar som tillhandahålls för kvalitetskontroll på varje objektglas. Den positiva kontrollen skall uppvisa ljust äppelgrön fluorescens i *Crithidia luciliae*-kinetoplasten, med eller utan färgning av kärnan. Den negativa kontrollen uppvisar ingen färgning av kinetoplasten. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av antikroppreagensen och bör inte uppvisa någon grön fluorescens. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid avläsning av antikroppnivåer börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:10. Den första brunnen med klart urskiljbar kinetoplastfärgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

Det medelvärde och spridningsområde för antikroppnivån (\pm en spädning på var sin sida om medelvärdet) som bestämts för detta lotnummer har fastställts i vårt laboratorium och uppges som vägledning. Denna kontroll tillhandahålls för att varje laboratorium skall ha tillgång till nDNA-testningens reproducerbarhet (precision). Eftersom kontrollen inte är avsedd att vara en indikator på antikroppnivåns precision, bör varje laboratorium etablera sitt eget medelvärde för antikroppnivåns ändpunkt för provet i fråga och använda denna information för att få tillgång till reproducerbarheten (precisionen) mellan olika serier.

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll med användande av Immuno Concepts fluorescerande nDNA-testsystem har ett medelantikroppvärde etablerats för varje lotnummer. Lotnumret, medelvärdet och spridningsområdet för antikroppnivån (\pm en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) finns angiven på ampullens etikett, och bör användas som vägledning för testsystemets prestanda.

De värden som erhålls i vårt laboratorium kan skilja sig från era. Några av de många faktorer som kan inverka på resultaten kan omfatta, men är inte begränsade till:

1. Vilken typ av ljuskälla som används. Ljuskällor av kvicksilver ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts/halogen. Ljuskällor av kvicksilver på 50 watt, 100 watt och 200 watt skiljer sig något i exciteringsenergi vid 495 nm. Kvarts-/halogenljuskällor på 100 watt ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts-/halogenljuskällor på 50 watt.

- Ljuskällans skick och ålder. Detta gäller framför allt för ljuskällor av kvicksilver, som i allmänhet uppvisar en gradvis minskning i exciteringsenergi vid 495 nm, innan de smälter ned. Denna gradvisa minskning i exciteringsenergi kan leda till en avsevärd förlust i känslighet över flera veckors tid. Detta problem kan undvikas genom att man för en tidsloggbook. För bästa resultat: Byt ut 50 watts glödlampor av kvicksilver efter 100 timmar och 100 eller 200 watts glödlampor av kvicksilver efter 200 timmar. Kvarts-/halogenljuskällor uppvisar i allmänhet ingen gradvis minskning i exciteringsenergi, innan de smälter ned.
- Vilken typ av matarfilter som används. Störningsmatarfilter ger större känslighet över en mycket smalare våglängd än absorptionsmatarfilter. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
- Korrekt justering mikroskopets ljusbana. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet för mer information.
- Objektivets numeriska bländaröppning. Med infallande ljusfluorescens (Epi) ökar fluorescensen exponentiellt, medan den numeriska bländaröppningen (NA) ökar additivt. Detta kan göra att ett 40X-objektiv med en NA på 0,65 läser en eller flera spädningar lägre än ett 40X-objektiv med en NA på 0,85. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet.
- Spärrfilter. Spärrfiltret minskar de speciella exciteringsvåglängderna och kan användas för att minska känsligheten. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
- Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas utförande.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

400 gångers total förstoring rekommenderas för att studera *Crithidia*.

Negativt: Ett serum betraktas som negativt för antikroppar mot nDNA om kinetoplastfluorescensen är mindre än eller lika med den negativa kontrollbrunnen. Nukleär färgning, utan kinetoplastfärgning, betraktas också som negativt för antikroppar mot nDNA.

Positivt: Ett serum betraktas som positivt, om kinetoplasten uppvisar en klart urskiljbar färgning med en fluorescens större än den negativa kontrollbrunnen.

Antikroppnivåer: Vid avläsning av antikroppnivåer börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:10. Den första brunnen med klart urskiljbar kinetoplastfärgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

FLUORESCENSENS INTENSITET

Fluorescensens intensitet kan semikvantifieras enligt de riktlinjer för fluorescerande antikroppreagenser som Centralerna för kontroll och förebyggande av sjukdom, Atlanta, Georgia, USA (CDC) har upprättat.

- 4+ Lysande gulgrön (maximal fluorescens)
- 3+ Mindre lysande gulgrön fluorescens
- 2+ Avgränsat cellmönster, men svag fluorescens
- 1+ Mycket dämpad fluorescens

Ett standardobjektglas för fastställande av dessa fluorescerande intensiteter, FITC QC Slide™, katalognummer 1900, kan beställas från Immuno Concepts N.A., Ltd.

RESULTATRAPPORTERING

Screening: Resultatet skall rapporteras som positiva eller negativa vid spädning 1:10.

Bestämning av antikroppnivå: Resultatet skall rapporteras som den sista seriespädningen med klart urskiljbar färgning av kinetoplasten. Resultat med en stark reaktion vid spädning 1:640 skall rapporteras som större än 1:640.

FÄRGNINGSKARAKTÄRISTIK

Kinetoplast: En jämn eller perifer färgning av den kinetoplast som finns i närheten av organismens flagellära område.

Resultat: Positiv för antikroppar mot nDNA.

Antigener: nDNA.

Sjukdomssamband: Höga antikroppnivåer tyder på aktiv SLE (20), eller vid tidigare diagnostiserad SLE, återkommande sjukdom eller bristande respons på behandling (21-23).

Kärna: En jämn, perifer, eller fläckig färgning av kärnan.

Resultat: Negativ för antikroppar mot nDNA.

Antigener: Nukleärassocierade antigener (21-23).

Sjukdomssamband: Positiv nukleär färgning kan tyda på ospecifik bindvävssjukdom.

OBSERVERA: Positiva ANA-resultat som erhållits genom HEp-2 eller andra substrat ger normalt inte motsvarande nukleära färgning på *C. luciliae*. Till exempel bevisar inte en fläckig ANA genom HEp-2 nukleär färgning på *C. luciliae*.

Basala knutar: En jämn färgning av de båda områden som är belägna där organismknuten ansluter till flagellen i ektoplasman.

Synonymer: Basala fötter.

Resultat: Negativ för antikroppar mot nDNA.

Antigener: Antigener associerade med basal knut.

Sjukdomssamband: Rapporterade hos SLE-patienter som inte uppvisar någon kinetoplast- eller nukleär färgning (37).

Flagell: Färgning av organismens flagell.

Synonymer: Organismens svansområde.

Resultat: Negativ för antikroppar mot nDNA.

Antigener: Okända flagellassocierade antigener.

Sjukdomssamband: Okänt.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av detektion av anti nDNA-antikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens historia och symptom, de fysiska upptäckterna och övriga diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för anti nDNA-antikroppar. Kliniska symptom, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, inklusive procainamid och hydralazin, kan orsaka en lupus erytematos-liknande sjukdom. Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa positiva antinukleära antikroppar, vilka i allmänhet är riktade mot nukleära histoner, även om antikropp till nDNA också har rapporterats (38-39).
4. Även om en högt titrerad nDNA i hög grad kan tyda på SLE, bör detta inte betraktas diagnostiskt, utan snarare ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria. Låga nDNA-antikroppnivåer är ofta fallet med sera hos patienter med reumatoid artrit, Sjögrens syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävssjukdom (21).
5. Eftersom det finns många olika alternativ att tillgå vad gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas att ljuskällor, filter och optik standardiseras, när man jämför patienters antikroppnivåer mellan laboratorier.
6. Patienter under steroidbehandling kan uppvisa negativa resultat för nDNA-antikropp (40).

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det förväntade värdet i den normala populationen är negativt i screeningspädning 1:10. Vissa läkemedel, t ex hydralazin, kan medföra produktion av nDNA-antikroppar (38-39)

PRESTANDA

Immuno Concepts nDNA-testsystem utvärderades genom jämförelse med två andra kommersiellt tillgängliga fluorescerande antikroppstester (41). Studien omfattade 103 serumprover från normala individer samt patienter med diagnoser som omfattade systemisk lupus erytematosus (SLE), blandad bindvävssjukdom (MCTD), Raynauds progressiva systemisk skleros-CREST-variant (PSS-CREST), reumatoid artrit (RA), reumatoid artrit hos barn (JRA) och andra bindvävssjukdomar. Sera testades vid de screeningspädningar som respektive tillverkare rekommenderade. Studieresultaten sammanfattas i följande tabell 1.

TABELL 1

DIAGNOS	Antal patienter	Immuno Concepts positiva 1:10	Tillverkare A Positiva 1:10	Tillverkare B Positiva 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD/överlappning	6	0	0	0
Raynaud's PSS-CREST	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Annan bindvävssjukdom	9	0	0	0
Sjukhuskontroller	11	1	1	1
Normala kontroller	24	0	0	0

Densjukhuskontrill som var positiv i alla *Crithidia luciliae* nDNA-tester uppvisade immunkomplex njursjukdom som inte motsvarade kriteriet för SLE-diagnos.

BIBLIOGRAFI

- 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.
- Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
- Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
- 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.
- Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
- 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.
- 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.
- Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
- Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
- Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
- Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. J. Biol. Chem. 254:10514 - 10522, 1979.
- 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.
- Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
- 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.
- 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.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
- 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.
- Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
- 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.
- 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.
- Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
- 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.
- 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.
- Wold, R. T., Young, F. E., Tan, E. M., et al. Deoxyribonucleic Acid Antibody: A Method to Detect its Primary Interaction With Deoxyribonucleic Acid. Science 161:806-807, 1968.
- Ginsberg, B., Keiser, H. A Millipore Filter Assay for Antibodies to Native DNA in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 16:199-207, 1973.
- Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. Clin. Exp. Immunol. 17:209-218, 1974.
- Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. J. Protozool. 15:132-136, 1968.
- 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.
- Weller, T. H., Coons, A. H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:789-794, 1954.
- 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.
- Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
- Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
- Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.
- Data on file. Immuno Concepts, Incorporated.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsförpackningen är skadad.



Fabrikant



Auktoriserad Representant
europiska unionen



Temperatur
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



FLUORESCERANDE nDNA TESTMETOD

OM laboratoriet använder en robot för att analysera proverna så skall rekommendationerna från tillverkaren gälla. Roboten skall vara programmerad med anvisad provspädning, provvolym och inkubations tid som ni kan se nedan.

1. REKONSTITUTION AV BUFFERT (PBS)

Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. PBS-bufferten kan täckas och förvaras i 2-25°C i maximalt fyra veckor.

2. SPÄDNING AV PATIENTPROV

Screening: Späd patientprovet till 1:10 genom att tillsätta 0,1 ml (100 µl) serum till 0,9 ml rekonstituerad PBS.

Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: För att framställa dubbla seriespädningar av screeningprov (t ex 1:20, 1:40, 1:80...1:640), avlägsna 0,5 ml av spädningen 1:10 och blanda med 0,5 ml av PBS för att uppnå spädningen 1:20. Fortsätt därefter med seriespädningarna på detta sätt.

3. SPÄDNING AV TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Behandla den tillhörande titrerbara kontrollen som ett ospädd patientprov. Späd kontrollen 1:10 genom att tillsätta 0,1 ml (100 µl) kontrollserum i 0,9 ml rekonstituerad PBS. Framställ dubbla spädningar av den titrerbara kontrollen (se skiss ovan).

4. IORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (20-25 µl/brunn)

Avlägsna objektglaset/objektglaset från påsen/påsarna och placera kontrollserum på kontrollserabrunnarna enligt följande: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen till rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) patientprov i de nummerade brunnarna.

VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.

5. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)

Placera objektglaset/-n i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk duger). Odlas, med locket på, i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).

6. PBS-SKÖLJNING

Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprutflaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.

OBSERVERA: Led PBS-flödet längs objektglasets mittlinje för att undvika korskontamination på trettonbrunnars objektglas genom att först luta glaset mot brunnarna 1-5 och därefter mot brunnarna 6-10.

7. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)

Tvätta objektglaset/-n under tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.

8. FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS (täck brunnarna med 10-12 droppar)

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför omedelbart objektglaset till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med fluorescerande antikroppreagens. Börja med att placera en droppe i varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Den fluorescerande antikroppreagens har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som finns kvar på objektglaset efter sköljning.

OBSERVERA: Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar under detta förfarande, annars tar substratet skada.

TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.

9. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)

Placera locket på inkubationskammaren och täck med en pappershandduk för att förhindra att det utsätts för ljus, om kammaren inte är ogenomskinlig. Odlas objektglaset/-n i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).

10. PBS-SKÖLJNING

Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.

11. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)

Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas.

12. MONTERING AV SKYDDSREMSEA

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten (Valfri). Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT DET ALDRIG STÅ UTAN SKYDDSREMSEA LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER. Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik lufffickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från objektglasets ena ände till den andra.

OBSERVERA: Överflödigt monteringsmedium på objektglaset kan leda till hög bakgrundsfluorescens på grund av ljusspridning, eller brist på tydlig upplösning av celler (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan.

TEKNISK HJÄLP: +1-916-363-2649

eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com