



COLORZYME[®] nDNA TESTSYSTEM

För diagnostisk användning in vitro
För yrkesmässigt bruk

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett indirekt enzymantikroppstest 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 immunofluorescerande teknik påvisar ett litet antal nukleärproteinspecificiteter (1). På grund av det höga sambandet mellan positiv ANA och 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 ett antal nukleära (4) och cytoplasmiska (5-7) makromolekyler under det senaste årtiondet 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, dermatomyositis, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävssjukdom (21) ofta har 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 hög nivå och eftersom de korrelerar med sjukdomens aktivitet (23) är det viktigt att de upptäcks för behandlingen av SLE-patienter.

Indirekt immunfluorescens har visat sig utgöra ett problem för vissa laboratorier på grund av att *Crithidia luciliae*-organismen är så liten, om inte optisk och fluorescerande utrustning av hög kvalitet används. Immuno Concepts Colorzyme[®] nDNA testsystem har utvecklats som en följd av detta och även på grund av behovet av att minska laboratoriets problem med reproducerbarheten på grund fluorescensmikroskopet.

Serumantikropp reaktiv mot nDNA detekteras genom färgning av kinetoplasten inuti organismen *Crithidia luciliae* (24). *C. luciliae* är en parasit på spyfluga och är inte patogen för människor. Dessa hemoflagellaters kinetoplast är en del av den stora mitokondrie, i vilken spiralformad nDNA är koncentrerad (24-25). På elektronmikrofoton syns kinetoplasten som en något konkav skivformad struktur innehållande mitokondrisk crista och en fibrös DNA-massa (26). 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, vilka kan förekomma med DNA-radioimmunanalys på kalvbräss (25, 27-31).

TESTPRINCIP

Immuno Concepts Colorzyme® nDNA-test använder indirekt enzymantikropptechnik. Patientprovet 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 ospecifikt bundna antikroppar odlas substratet med en antihuman antikroppreagens konjugerad med pepparrotsperoxid. Om resultaten är positiva bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en enzymmärkt antikropp bunden till en human anti-nDNA-antikropp, som i sin tur är bunden till en nDNA-antigen. Detta komplex kan visualiseras genom odling av objektglaset i en färgreagens som innehåller ett enzym specifikt substrat. Reaktionen mellan den enzymmärkta antikroppen och det enzymspecifika substratet leder till en färgreaktion på objektglaset, som är synlig i standardljusmikroskop. I positiva prov uppvisar kinetoplasten en mörk blåfärgning inuti *Crithidia luciliae*-organismerna. Om provet är nDNA-negativt, uppvisar kinetoplasten inte någon färgning.

SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM INGÅR

Användning: Alla komponenter levereras bruksfärdiga utan krav på delning eller rekonstitution (utom PBS-bufferten och Colorzyme® färgreagensen 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. Efter rekonstitution skall Colorzyme® färgreagens lagras i en stängd behållare i rumtemperatur i högst 30 dagar. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme® färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

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

REAKTIVA REAGENSER

Objektglas för substrat [SLIDE]: nDNA-substratobjektglas som använder *Crithidia luciliae* och är stabiliserade direkt på testbrunnarna. Det unika vallgravsformade objektglaset minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspåsen är fylld med en stabil giffri gas som bidrar till cellernas stabilitet.

Positiv kontroll [CONTROL +]: Katalognr 3021. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humant kontrollserum med antikropp som är specifik för nDNA-antigener. Detta serum uppvisar en positiv färgningsreaktion av kinetoplasten eller kinetoplasten och kärnan med Immuno Concepts *Crithidia luciliae*-substrat.

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

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

Enzymantikroppreagens [CONJ|HRP]: Katalognr 5009 (9,0 ml), 5075 (23,0 ml). Antihuman IgG konjugerade till pepparrotsperoxid (HRP). Reagensen levereras bruksfärdig i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart tionde objektglas i kompletta testsatser.

Färgreagens [PWDR|CRP]: Katalognr 4066. HRP-specifikt enzymsubstratpulver innehållande 4-kloro-1-naftol. Varje förpackning innehåller pulver för att framställa 150 ml självaktiverande Colorzyme® färgreagens.

Framställning: Lös upp innehållet i en påse i 150 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda väl tills preparatet har lösts upp helt och hållet. Denna färgreagens är stabil i 30 dagar i rumtemperatur i en stängd behållare. Färgreagensen kan återanvändas i högst 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumling eller opalescens utan synlig fällning vid återanvändning är normalt. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme®-reagens användas med maximalt tjugo objektglas.

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 leverans av 20-25 µl volymer
Tre Coplin-kärl eller färgningsskålar för objektglas
Klämflaska eller Pasteur-pipetter
Serologiska pipetter
Enliters skruvlockbehållare (för PBS-buffert)
Stängd behållare för förvaring av Colorzyme® färgreagens
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att utföra seriespädningar
Läskpapper eller pappershanddukar
Inkubationskammare
Engångshandskar
Laborietidur
Ljuskroskop (standardmodell) med kapacitet för 200 och 400 gångers förstoring

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Allt material av humant ursprung som använts för att preparering av 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) och hepatit B ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan helt och hållet garantera att det inte förekommer HIV-1-, HIV-2-, hepatit C-, hepatit-B-virus eller andra smittämnen. Därför skall allt kontrollera hanteras som potentiellt smittsamt.
- Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i manualen från Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitut: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
- Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
- Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparledningar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras, skall man spola med stora mängder kranvatten för att avlägsna eventuella rester i avloppssystemet. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
- Denna sats är avsedd för diagnostiskt bruk *in vitro*.
- Om hemolyserat eller lipemiskt sera måste användas skall upp inaktivt sera värmas i 30 minuter i 56°C för optimala resultat. Mikrobiellt kontaminerat sera skall inte användas.
- Det titrerbara kontrollserumet är avsett för användning vid övervakning av reproducerbarheten mellan olika loter eller serier. Det är inte avsett för mätning av den totala känsligheten eller analysens specificitet.
- Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
- Undvik alltid stänk eller alstring av aerosoler.
- Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
- Korskontaminationer mellan reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
- Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. Allt glas måste vara rent och torrt före användning.
- Placera alla reagenser, objektglas och prov i rumstemperatur (18-25°C) före användning.
- Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser och tvätta händerna noggrant efteråt.
- Mikrobiell kontamination av reagenser eller prov kan ge felaktiga resultat.

16. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prover med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om kontakt ändå skett.
17. Färgreagens kan återanvändas i högst 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumling eller opalescens, utan synlig fällning vid återanvändning, är normalt. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme® färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

PROVTAGNING

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

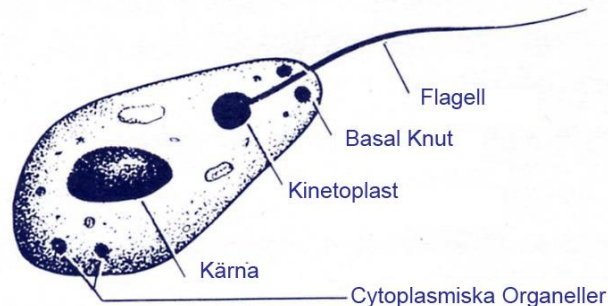
Störande ämnen: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt bör inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till felaktiga resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före testning.

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 skall inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerrum.

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 som består av lipoprotein. Plasmamembranet ligger inuti denna tunna hinna. Plasmamembranet omsluter cytoplasman bestående av a) ett yttre ektoplasmalager som omfattar den basala knuten och flagellen och b) endoplasman, en mycket flytande inre cytoplasma som omfattar kärnan, kinetoplasten och andra organeller.

Den tunna hinnan, plasmamembranet, den basala knuten och flagellen betraktas i allmänhet som fasta föremål inuti organismen, med en viss variation i placering från cell till cell. Även om kinetoplasten i allmänhet befinner sig närmare den basala knuten än kärnan, kan den exakta placeringen av denna organell variera från cell till cell på grund av endoplasmans flytande konsistens.

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

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

KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och PBS-kontroller skall testas en gång per körning. Den positiva kontrollen skall uppvisa mörkblå/lila färgning 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 skall inte visa någon blå färgning. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid läsning 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 urskiljningsbar kinetoplastfärgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

Det medelvärde och spridningsområde för antikroppnivån (\pm en dubbel 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 utgöra 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 användning av Immuno Concepts Colorzyme® nDNA-testsystem har ett medelantikroppvärde fastställts för varje lotnummer. Lotnumret, medelvärdet och spridningsområdet för antikroppnivån (\pm en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) anges på ampullens etikett, och bör användas som en vägledning för testsystemets prestanda.

De värden som erhålls i vårt laboratorium kan skilja sig från era. Några av de många faktorer som kan påverka era resultat kan vara, men är inte begränsat till:

1. Korrekt placering av mikroskopets ljusbana. Se bruksanvisningen till mikroskopet för mer information.
2. Objektivets numeriska bländaröppning. Den numeriska bländaröppningen är relaterad till ljussamlingskapaciteten och objektivets upplösning. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet.
3. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas prestanda.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

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

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

Positivt: Ett serum betraktas som positivt om kinetoplasten uppvisar en klart urskiljningsbar färgning som är större än den negativa kontrollbrunnens.

Antikroppnivåer: Vid avläsning av antikroppnivåerna 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 urskiljningsbar kinetoplastfärgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

ENZYM FÄRGNINGENS INTENSITET

Färgningsgradens intensitet har inget bevisat kliniskt värde och endast begränsat värde som indikator på antikroppnivån (32). Registrera screeningresultaten som starkt positiva eller positiva och titrera därefter.

Starkt positiv reaktion: Mörk till mycket mörkblå färgning med en klar kinetoplastkontur.

Positiv reaktion: Svag eller dämpad blålila färgning med större färgningsvariabilitet mellan organismerna. Cellkonturen kan vara mindre väldefinierad i vissa organismer, men en majoritet av organismerna uppvisar ändå en klart urskiljningsbar färgning av kinetoplasten.

RAPPORTERING AV RESULTATET

Screening: Resultaten skall rapporteras som starkt positiva, positiva eller negativa vid spädning 1:10.

Bestämning av antikroppnivå: Resultaten skall rapporteras som den sista seriespädningen med klart urskiljningsbar 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 (33).

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 eventuell behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, bland annat 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 antikroppar mot nDNA också har rapporterats (34-35).
4. Även om en högt titrerad nDNA i hög grad kan tyda på SLE, bör detta inte betraktas diagnostiskt, utan i stället ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria. Låga nDNA-antikroppnivåer är ofta fallet med sera från patienter med reumatoid artrit, Sjögrens syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävssjukdom (21).
5. Patienter under steroidbehandling kan uppvisa negativa resultat i fråga om nDNA-antikropp (36).

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det förväntade värdet i den normala populationen är negativt vid screeningspädnigen 1:10. Vissa läkemedel, t ex hydralazin, kan medföra produktion av nDNA-antikroppar (34-35).

PRESTANDA

DETEKTION

Immuno Concepts Colorzyme[®]-nDNA-testsystem har testats avseende överensstämmelse med Immuno Concepts indirekta immunfluorescens-nDNA-test genom screening och titrering av 49 serumprover som representerar en mängd olika autoantikroppar vanliga vid systemiska reumatiska sjukdomar. För alla sera som testades motsvarade enzymresultaten till 100% Immuno Concepts immunofluorescerande nDNA (37).

Immuno Concepts fluorescerande nDNA-testsystem hade tidigare utvärderats genom jämförelse med två andra fluorescerande antikroppstester i kommersiell distribution (37). Studien omfattade 103 serumprover från normala individer och patienter med diagnoser som omfattade systemisk lupus erytematosus (SLE), blandad bindvävssjukdom (MCTD), Raynauds progressiva systemiska skleros-CREST-variant (PSS-CREST), reumatoid artrit (RA), reumatoid artrit hos barn (JRA) och andra bindvävssjukdomar. Sera testades med de screeningspädnigar som respektive tillverkare rekommenderade. Studieresultaten sammanfattas i 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

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

PRECISION

Tio nDNA-positiva sera titrerades i duplikat vid tre tillfällen. I samtliga fall återskapades alla antikroppnivåer inom plus eller minus en dubbel spädning (37). Dessa resultat överensstämmer med den precisionsstandard som Centralerna för sjukdomskontroll, Atlanta, Georgia, upprättat för fluorescerande antikroppreagenser.

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., Fritzl, 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.
- Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. J. Protozool. 15:132-136, 1968.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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



Fabrikant



Auktoriserad Representant
europeiska unionen



Temperatur
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



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-Sv

Rev 3.1 © Copyright 2020

COLORZYME® 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 högst fyra veckor.

2. REKONSTITUTION AV FÄRGREAGENS

Lös upp innehållet i en påse i 150 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda väl tills preparatet har lösts upp helt och hållet. Denna färgreagens är stabil i 30 dagar i rumstemperatur i stängd behållare. Färgreagensen kan återanvändas i högst 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumling eller opalescens utan synlig fällning vid återanvändning är normalt. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme® färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

3. SPÄDNING AV PATIENTPROV

Screening: Späd patientprov 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, avlägsnar man 0,5 ml av spädningen 1:10 och blandar med 0,5 ml PBS för att uppnå spädningen 1:20. Fortsätt därefter med seriespädningarna på detta sätt.

4. 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 nedan).

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

Avlägsna objektglaset/objektglaset från påsen/påsarna och placera kontrollsera på kontrollserabrunnarna enligt följande: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen mot rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) patientprov i de numrerade brunnarna. **VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.**

6. 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).

7. 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.

8. 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.

9. ENZYMANTIKROPPREAGENS (täck brunnarna med 10-12 droppar)

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 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 enzymantikroppreagens. Börja med att placera en droppe över varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Enzymantikroppreagensen har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som är kvar på objektglaset efter sköljning.

OBSERVERA: Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar under detta förfarande, annars tar substratet skada. **TORCA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN ENZYMANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.**

10. ODLA OBJEKTGLASEN (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)

Placera locket på inkubationskammaren. Odlas objektglaset/-n i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).

11. PBS-SKÖLJNING

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

12. 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.

13. ODLING AV FÄRGREAGENS (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka därefter objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Placera omedelbart objektglaset(n) i ett Coplin-kärl med aktiverad färgreagens och odla i 30 minuter.

14. PBS-SKÖLJNING

Avlägsna ett objektglas åt gången från Coplin-kärl och skölj varje sida av objektglaset 4-5 sekunder med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna. Placera varje PBS-sköljt objektglas i ett Coplin-kärl fyllt med destillerat eller avjoniserat vatten tills alla objektglas har avlägsnats från färgreagensen. Gå direkt till steg 15.

15. MONTERING AV SKYDDSREMSEA

Avlägsna ett objektglas åt gången från det destillerade eller avjoniserade vattnet och knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. **TORCA 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 skyddsremsan försiktigt på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från objektglasets ena ände till den andra. **OBSERVERA:** Överflödigt monteringsmedium på objektglaset kan leda till att cellerna inte får en klar upplösning (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan. Objektglasen kan avläsas direkt eller förvaras under en längre tid i 2-10°C utan att förlora reaktivitet.

TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649
eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

