



SISTEMA DE ANÁLISIS DE IgG ANTI-ADNn POR INMUNOFLUORESCENCIA

**Para uso diagnóstico in vitro
Para El Uso Profesional**

USO PREVISTO: Este sistema de prueba es para uso diagnóstico in vitro para la detección cualitativa y la semicuantificación de anticuerpos anti-nDNA de la clase IgG en suero humano mediante microscopía fluorescente manual o con el microscopio semiautomático de fluorescencia Image Navigator®. Este sistema de prueba se utilizará como ayuda en el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES) junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio. Un operador capacitado debe confirmar los resultados generados con el software y el dispositivo semiautomático Image Navigator®.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) pueden producir anticuerpos contra diversos antígenos nucleares, pero los anticuerpos contra el antígeno Sm (Smith) y contra el ADNn muestran la máxima correlación con la enfermedad (1). Los anticuerpos anti-Sm adoptan un patrón de tinción de ANA moteado, mientras que los anti-ADNn adoptan un patrón homogéneo. Aunque puede haber niveles bajos de anticuerpos anti-ADNn en el suero de pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide y enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (2), prácticamente sólo son elevados en el LES. Se cree que los anticuerpos anti-ADNn intervienen en la patogenia de las formas más graves de LES, cuando se depositan como inmunocomplejos (3). Los anticuerpos anti-ADNn alcanzan títulos elevados y, como se correlacionan con la actividad de la enfermedad (4), su detección es importante en el tratamiento de los pacientes con LES.

Existen varios análisis para la detección de anticuerpos anti-ADNn. Los métodos más habituales son la inmunofluorescencia indirecta, el radioinmunoanálisis, la contrainmunolectroforesis y la inmunodifusión (5-8). El sistema de análisis de IgG anti-ADNn de Immuno Concepts es un método de detección indirecta de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFA). El anticuerpo sérico que reacciona con el ADNn se detecta por la tinción del cinetoplasto situado en el interior de microorganismo *Crithidia luciliae* (9). *C. luciliae* es un parásito de la mosca azul no patógeno para los seres humanos. El cinetoplasto de estos hemoflagelados forma parte de la gran mitocondria en la que se concentra el ADNn helicoidal (9-10). En microfotografías electrónicas, el cinetoplasto aparece como una estructura ligeramente cóncava y discoide que contiene crestas mitocondriales y una masa de ADN fibroso (11). El cinetoplasto se encuentra entre el núcleo, localizado en el centro, y el cuerpo basal del flagelo. Como el ADNn del cinetoplasto no contiene contaminantes de ADN monocatenario (ADNmc), en teoría se eliminan los posibles problemas de falsos positivos por reacción con el ADNmc que se pueden producir en el radioinmunoanálisis de ANA de timo de ternera (12-16).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El análisis de IgG anti-ADNn de Immuno Concepts emplea la técnica indirecta de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia descrita por primera vez por Weller y Coons (17). Las muestras de los pacientes se incuban con un sustrato antigénico que permite la unión específica de los autoanticuerpos al ADNn del cinetoplasto. Si hay anticuerpos anti-ADNn, se forma un complejo antígeno-anticuerpo estable. Tras el lavado para retirar los anticuerpos unidos de forma inespecífica, se incuban el sustrato con anticuerpos antihumanos conjugados con fluoresceína. Si los resultados son positivos se forma un complejo estable con tres partes: el anticuerpo fluorescente unido al anticuerpo

anti-ADNn humano, unido a su vez al antígeno anti-ADNn. Este complejo se puede visualizar con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

En las muestras positivas, el cinetoplasto o el cinetoplasto y el núcleo mostrarán una fluorescencia de color verde manzana brillante en el interior de los microorganismos *Crithidia luciliae*. Si la muestra es negativa para los anticuerpos IgG anti-ADNn, el cinetoplasto no mostrará fluorescencia.

COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

Utilización: Todos los componentes se entregan listos para su empleo, sin necesidad de fragmentarlos ni prepararlos (excepto el tampón PBS, que debe ser disuelto en agua desionizada o destilada antes de utilizarlo).

Conservación: Todos los componentes se pueden conservar en refrigerador a 2-10°C. Una vez preparado, el tampón PBS debe conservarse en envase cerrado con tapón de rosca y se conserva entre 2 y 25°C.

Estabilidad: Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.

REACTIVOS

Portaobjetos de sustrato **SLIDE:** N° de catálogo 3007, 3014. Portaobjetos con sustrato de ADNn, utilizando *Crithidia luciliae* estabilizado directamente en los pocillos del análisis. El exclusivo diseño de los fosos del portaobjetos reduce al mínimo la contaminación cruzada de los pocillos durante la prueba. La bolsa que contiene el portaobjetos se rellena con un gas inerte no tóxico que contribuye a la estabilidad de las células.

Control positivo **CONTROL|+:** N° de catálogo 3021. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo con anticuerpo específico contra los antígenos ADNn. Este suero produce una brillante reacción de tinción positiva del sustrato de *Crithidia luciliae* de Immuno Concepts.

Suero de control titulable **TC:** N° de catálogo 3026. Vial listo para usar, que contiene 0,5 ml de suero de control humano positivo que será tratado como si fuera una muestra de paciente sin diluir. Consulte el valor de la titulación en la etiqueta del vial.

Suero de control negativo **CONTROL|-:** N° de catálogo 3031. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano negativo. El suero de control negativo no mostrará tinción específica del cinetoplasto del sustrato de *Crithidia luciliae* de Immuno Concepts.

Reactivo con anticuerpos fluorescentes **CONJ|FITC:** N° de catálogo 3009G (9,0 ml), 3075G (23 ml). IgG antihumana (específica de la cadena gamma) conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC). El reactivo se presenta listo para usar en frascos con cuentagotas de precisión, con 9,0 ml por cada 10 portaobjetos, en kits de análisis completos.

ELEMENTOS NO REACTIVOS

Polvo tampón PBS **PWDR|PBS:** N° de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. (Los kits de análisis completos llevan una bolsa de polvo tampón por cada cinco portaobjetos).

Preparación: Disuelva una bolsa de polvo tampón en 1 litro de agua desionizada o destilada, tápelo el recipiente y almacenar entre 2 y 25° C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles.

Medio de montaje semipermanentes **SOLN|MM:** N° de catálogo 1111. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 5,0 ml de medio para preparaciones microscópicas a base de glicerol.

Cubreobjetos **CVSLP:** N° de catálogo 1042. Cada envase contiene diez cubreobjetos de vidrio n° 1 de 24 x 64 mm.

OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas para dispensar volúmenes de 20-25 µl
Jarras Coplin o platillos de tinción
Frasco para exprimir o pipetas de Pasteur
Pipetas serológicas
Agua desionizada o destilada
Probetas para preparar las diluciones de suero
Papel secante o toallas de papel
Guantes desechables
Envases de un litro con tapón de rosca (para el tampón PBS)
Cronómetro
Microscopio de fluorescencia equipado con un filtro excitador de 495 nm y un filtro de barrera de 515 nm
Placa de Petri u otra cámara de incubación

PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos aprobados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los sueros de control deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de paciente deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
4. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o con las conducciones de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
6. Si fuera necesario utilizar sueros hemolizados o lipémicos, caliéntelos para inactivarlos a 56°C durante 30 minutos para obtener resultados óptimos. No utilice sueros con contaminación microbiana.
7. El suero de control titulable debe utilizarse para controlar la reproductibilidad entre lotes y entre ciclos. No está concebido para medir la sensibilidad o la especificidad generales del ensayo.
8. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
9. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
10. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser falsos.
11. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
12. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
13. Todos los reactivos, portaobjetos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
14. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
15. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
16. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Obtención: La muestra ideal es suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25°C). Se separará el suero del coágulo por centrifugado cuanto antes, para que la hemólisis sea mínima.

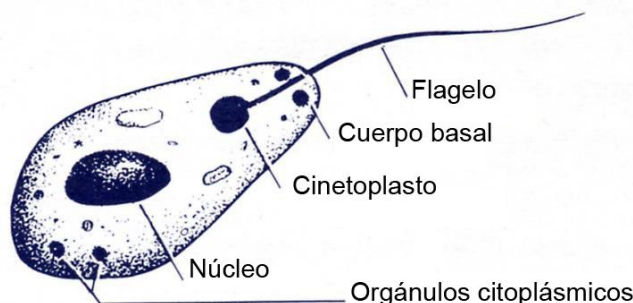
Sustancias que interfieren: No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados falsos. Si la muestra presenta partículas visibles, éstas deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

Conservación: Los sueros se pueden conservar a 2-10°C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

PRECAUCIÓN: Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos o negativos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para interpretar correctamente los resultados hay que reconocer claramente las diversas características morfológicas del microorganismo *Crithidia luciliae*.



La cubierta externa de la mayor parte de los protozoos consiste en una capa pelicular formada por lipoproteínas. En el interior de la película se encuentra la membrana plasmática. En ésta se incluye el citoplasma, formado por a) una capa de ectoplasma externo que contiene el cuerpo basal y el flagelo, y b) el endoplasma, un citoplasma interno muy líquido que contiene el núcleo, el cinetoplasto y otros orgánulos.

En general, se considera que la película, la membrana plasmática, el cuerpo basal y el flagelo son estructuras permanentes del interior del microorganismo, con escasa variabilidad en la localización de unas células a otras. Aunque por lo general el cinetoplasto se localiza más cerca del cuerpo basal que el núcleo, la localización exacta de este orgánulo puede variar de unas células a otras debido a la naturaleza líquida del endoplasma.

Para distinguir claramente el cinetoplasto del núcleo hay que observar el pocillo de control positivo. El cinetoplasto siempre estará más cerca del flagelo (ilustración anterior). El cinetoplasto no se tiñe en el pocillo de control negativo, pero sí en el positivo.

SÓLO DEBE ANALIZAR UN MICROORGANISMO BIEN DEFINIDO POR CAMPO. LA MORFOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS PUEDE VARIAR DEBIDO A LA FIJACIÓN DURANTE LA FASE DE CRECIMIENTO LOGARÍTMICO.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles positivos, negativos y PBS deben probarse una vez por proceso. El control positivo debe presentar una fluorescencia de color verde manzana brillante en el cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, con o sin tinción del núcleo. El cinetoplasto no se tiñe en el control negativo. El control PBS se emplea para observar la tinción inespecífica del reactivo de anticuerpos, y no debe dar fluorescencia verde. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no es válida y debe repetirse.

CONTROL OPCIONAL DE LA TITULACIÓN

Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "retrocediendo" hasta la dilución 1:10. El primer pocillo en el que se aprecie un patrón discernible de tinción del cinetoplasto corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

El título medio y el rango de títulos (\pm una dilución a cada lado de la media) determinados para este número de lote han sido establecidos en nuestro laboratorio, y se consideran la norma. Este control se facilita para que cada laboratorio pueda evaluar la reproducibilidad (precisión) de sus análisis de anti-ADNn. Como quiera que este control no ha sido diseñado como indicador de la exactitud de la titulación, cada laboratorio deberá establecer su propio criterio de

valoración del título medio para cada muestra, utilizando esta información para evaluar la reproducibilidad (precisión) de unos ciclos a otros.

Mediante la reiterada evaluación de este control tituable utilizando el sistema de análisis de IgG anti-ADNn por inmunofluorescencia de Immuno Concepts, se ha establecido un título medio para cada número de lote. El número de lote, el título medio y el rango de títulos (\pm una dilución doble a cada lado de la media) figuran en la etiqueta del vial y deben servir como guía para el funcionamiento del sistema de análisis.

Puede que los valores obtenidos en nuestro laboratorio difieran de los suyos. He aquí algunos de los muchos factores que pueden afectar a sus resultados:

1. El tipo de luz utilizada. Las fuentes de luz de mercurio producen una energía de excitación a 495 nm mayor que las de cuarzo/halógenas. Las fuentes de luz de mercurio de 50, 100 y 200 vatios difieren poco en la energía de excitación a 495 nm. Las fuentes de luz de cuarzo/halógenas de 100 vatios producen una energía de excitación a 495 nm superior a la proporcionada por las de cuarzo/halógenas de 50 vatios.
2. El estado de la fuente de luz y su edad. Esto es especialmente cierto para las fuentes de luz de mercurio, que suelen experimentar una reducción gradual de la energía de excitación a 495 nm antes de agotarse. Esta gradual reducción de la energía de excitación puede producir una pérdida significativa de la sensibilidad en un plazo de semanas. El problema se puede evitar con un registro cronológico. Para que los resultados sean óptimos, cambie las bombillas de mercurio de 500 vatios cada 100 horas, y las de 100 ó 200 vatios cada 200 horas. Por lo general, las fuentes de luz de cuarzo/halógenas no experimentan una reducción gradual de la energía de excitación antes de agotarse.
3. El tipo de filtro excitador utilizado. Los filtros excitadores por interferencia proporcionan mayor sensibilidad en una longitud de onda mucho menor que los filtros excitadores por absorción. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
4. Correcta alineación del haz de luz del microscopio. Consulte las instrucciones del manual del microscopio de fluorescencia.
5. La apertura numérica del objetivo. Si se emplea fluorescencia por luz incidente (Epi), la fluorescencia aumenta exponencialmente con la apertura numérica (NA) del objetivo. Así, puede que un objetivo de 40X con una NA de 0,65 interprete una o más diluciones como inferiores a las determinadas con un objetivo de 40X con una NA de 0,85. La apertura numérica va impresa a un lado del objetivo.
6. Filtros de supresión. Los filtros de supresión reducen longitudes de onda de excitación concretas, y se pueden utilizar para reducir la sensibilidad. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
7. Precisión y exactitud de la técnica de dilución, del equipo y de la realización de los procedimientos de análisis.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PACIENTE

Para ver *Crithidia* se recomienda un aumento total de 400X.

Negativos: Se considera que un suero es negativo para los anticuerpos anti-ADNn si la fluorescencia del cinetoplasto es igual o inferior a la del pocillo de control negativo. La tinción del núcleo sin tinción del cinetoplasto también se considera negativa para los anticuerpos anti-ADNn.

Positivos: Se considera que un suero es positivo si el cinetoplasto se tiñe de forma discernible con una fluorescencia superior a la del pocillo de control negativo.

Títulos: Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "retrocediendo" hasta la dilución 1:10. El primer pocillo en el que se aprecie un patrón claramente discernible de tinción del cinetoplasto corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA

Es posible semicuantificar la intensidad de la fluorescencia con arreglo a las directrices sobre reactivos con anticuerpos fluorescentes establecidas por los Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC).

- 4+ Verde manzana brillante (fluorescencia máxima)
- 3+ Fluorescencia de color verde manzana menos brillante
- 2+ Patrón celular definido, pero fluorescencia tenue
- 1+ Fluorescencia muy leve

Immuno Concepts, N.A. Ltd. facilita un portaobjetos estándar para la determinación de la intensidad de la fluorescencia, FITC QC Slide™, número de catálogo 1900.

NOTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Selección: Se indicará si el resultado es positivo o negativo a la dilución 1:10.

Titulación: El resultado que se notifica es el de la última dilución en la que se observa una tinción claramente discernible del cinetoplasto. Si se obtiene una reacción intensa con la dilución 1:640, se notificará como igual o superior a 1:640.

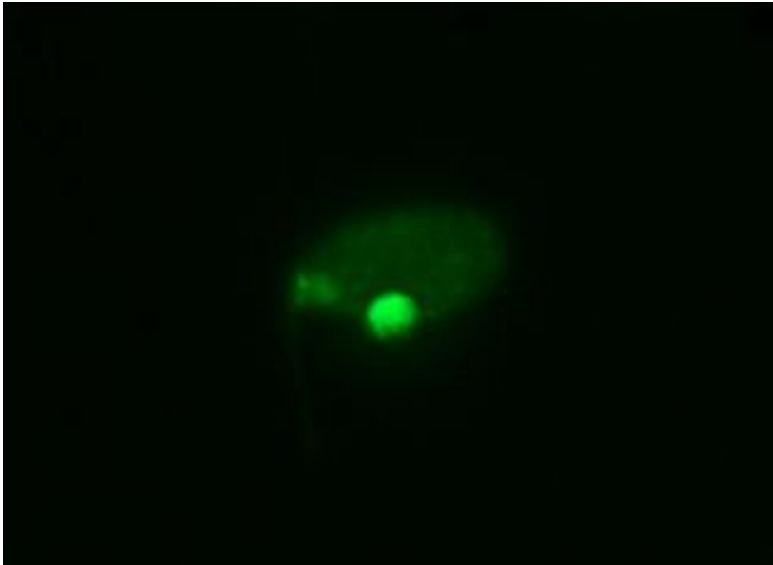
CARACTERÍSTICAS DE TINCIÓN

Cinetoplasto: Tinción suave o periférica del cinetoplasto, cerca de la región flagelar del microorganismo.

Resultado: Positivo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: ADNn.

Asociación a enfermedades: Los títulos elevados sugieren LES activo (1) o, en caso de LES diagnosticado anteriormente, recurrencia o ausencia de respuesta al tratamiento (2-4).



Las imágenes para la tinción del Núcleo, el Cuerpo Basal y el Flagelo representan tinciones consideradas negativas para anticuerpos anti-ADNn.

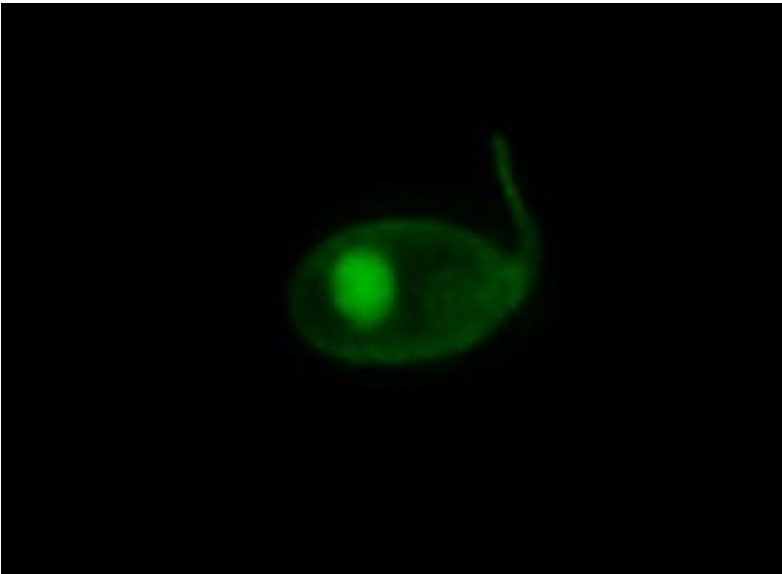
Núcleo: Tinción suave, periférica o moteada del núcleo.

Resultado: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos asociados al núcleo (2-4).

Asociación a enfermedades: La tinción nuclear positiva no se asocia a ninguna enfermedad del tejido conjuntivo concreta.

NOTA: Normalmente los resultados ANA positivos obtenidos con HEp-2 u otros sustratos no producen la tinción nuclear correspondiente en *C. luciliae*, p.ej., un ANA moteado con HEp-2 no muestra tinción nuclear moteada en *C. luciliae*.



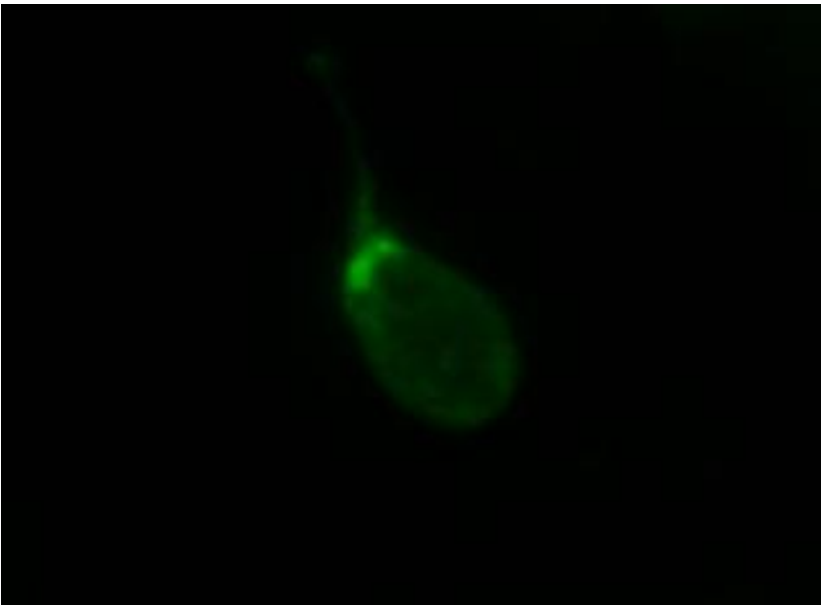
Cuerpos basales: Tinción lisa de las dos esferas localizadas donde el flagelo se une al microorganismo en el ectoplasma.

Sinónimos: Pies basales.

Resultados: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos asociados al cuerpo basal.

Asociación a enfermedades: Se ha notificado en pacientes con LES en quienes no se tiñe el cinetoplasto ni el núcleo (18).



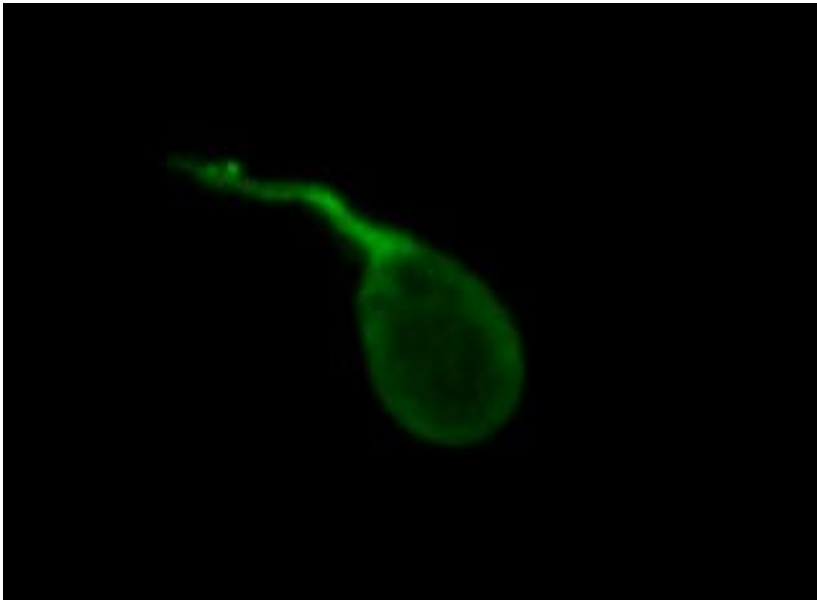
Flagelo: Tinción del flagelo del microorganismo.

Sinónimos: Región de la cola del microorganismo.

Resultados: Negativo para anticuerpos anti-ADNn.

Antígenos: Antígenos desconocidos asociados al flagelo.

Asociación a enfermedades: Desconocida.



LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos anti-ADNn. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos anti-ADNn. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.
3. Determinados fármacos, como procainamida e hidralazina, pueden inducir un trastorno similar al lupus eritematoso. Los pacientes con LE inducido por fármacos pueden presentar ANA positivos dirigidos habitualmente contra las histonas nucleares, aunque no se han notificado anticuerpos anti-ADNn (19-20).
4. Aunque una titulación elevada de anti-ADNn puede ser muy sugerente de LES, no debe considerarse diagnóstica, sino parte de la historia clínica general de un paciente. Es frecuente encontrar títulos bajos de anticuerpos anti-ADNn en sueros de pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide y enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (2).
5. Como quiera que existen muchas opciones en los microscopios de fluorescencia, se recomienda estandarizar las fuentes de luz, los filtros y los medios ópticos para comparar los títulos de los pacientes obtenidos en diferentes laboratorios.
6. Los pacientes en tratamiento con esteroides pueden dar resultados negativos para los anticuerpos anti-ADNn (21).

VALORES ESPERADOS

El valor previsto en la población normal es negativo a la dilución 1:10 utilizada para la selección. Determinados fármacos, como hidralazina, pueden inducir la producción de anticuerpos ADNn (19-20).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se ha comparado el sistema de análisis de IgG anti-ADNn por inmunofluorescencia de Immuno Concepts con otros sistemas de análisis de IgG anti-ADNn por inmunofluorescencia comercializados. La población estudiada consistió en 121 muestras enviadas a laboratorios clínicos para la evaluación de anti-ADNn, 100 donantes de sangre, y dos estándares de la OMS que contienen anticuerpos anti-ADNn. Todas las muestras fueron evaluadas en paralelo con el dispositivo sujeto y el dispositivo predicado. Según estas comparaciones, se obtuvieron los siguientes datos:

		Análisis del predicado de IgG anti-ADNn	
		Positivo	Negativo
IgG anti-ADNn de Immuno Concepts	Positivo	28	0
	Negativo	2	193

Estos datos arrojan las siguientes estadísticas: porcentaje de acuerdo positivo, 93,3 % (28/30) [77,6 – 99,2 %]; concordancia porcentual negativa, 100 %, (193/193) [97,7 – 100,0 %]; acuerdo general, 99,1 %, (221/223) [96,6 – 100,0 %].

Una de las dos muestras “falsas negativas” fue negativa para los anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta con células HEp-2, y no satisfaría los criterios de selección para el análisis de anti-ADNn de la mayor parte de los laboratorios clínicos.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS TÍTULOS

Para determinar la reproducibilidad intra ensayos un mismo técnico analizó 30 copias de un solo suero positivo para anti-ADNn en un solo ciclo. La valores de la media y la moda de estos datos fueron de 1:160, con un coeficiente de variación geométrica del 0,78%. Para determinar la variabilidad entre ensayos se examinaron los valores de los títulos para un solo suero positivo para anti-ADNn, analizado en quince lotes de kits diferentes. Los valores de la media y del modo de estos datos también fueron de 1:160, con un coeficiente de variación geométrica del 0,82%. Tanto en los análisis entre ensayos como en los intra-ensayos, todos los valores de los títulos fueron igual a ± 1 dilución de la mediana.

USO CON EL NAVEGADOR DE IMÁGENES®

Image Navigator® es el sistema de microscopio semiautomático de Immuno Concepts para leer los portaobjetos fluorescentes de ADNn. En una comparación del Image Navigator® con la lectura convencional de láminas fluorescentes de *Crithidia luciliae*, se obtuvieron los siguientes datos:

Portaobjetos con sustrato de *Crithidia luciliae* (n=479):

Acuerdo positivo: 100,0% (55/55) [92,2 – 100,0%]

Concordancia negativa: 100,0% (424/424) [98,9 – 100,0%]

Concordancia de punto final de título: 100,0 % (55/55) [92,2 – 100,0 %]

Se obtuvo una cohorte de 172 muestras de pacientes que previamente habían sido diagnosticados de LES. Todas las muestras se analizaron con portaobjetos de sustrato de *Crithidia luciliae* de Immuno Concepts. En esta población seleccionada, el porcentaje clínico de sensibilidad diagnóstica para LES fue del 30,2 % [23,8 - 37,5 %] para la microscopía fluorescente convencional y del 30,2 % [23,8 - 37,5 %] para las lecturas del monitor Image Navigator®.

Se obtuvo una cohorte de 307 muestras de pacientes con enfermedades distintas al LES. La especificidad clínica fue del 99,0 % [97,0 – 99,8 %] para la microscopía fluorescente convencional y del 99,0 % [97,0 – 99,8 %] para las lecturas del monitor Image Navigator®.

BIBLIOGRAFICI

1. 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.
2. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia lucilliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
9. Aarden, L. A., DeGroot, E. R., Feltkamp, T.E.W. Immunology of DNA. III *Crithidia lucilliae*, a Simple Substrate for the Determination of Anti-dsDNA with the Immunofluorescent Technique. Ann. N.Y. Acad. Sci. 254:505-515, 1975.
10. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. J. Protozool. 15:132-136, 1968.
11. 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.
12. 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.
13. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. I: 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.
14. Deegan, M. J., Walker, S. E., Lovell, S. E. Antibodies to Double Stranded DNA. A Comparison of the Indirect Immunofluorescent Test Using *Crithidia lucilliae* and the DNA-Binding Assay. Am. J. Clin. Pathol. 69:599-604, 1978.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Vogel, J. C., Roberts, J. L., Lewis, E. J. A Non-Anti-DNA Antibody Detected With the *Crithidia lucilliae* Anti-DNA Assay. New Engl. J. Med. 303:458-459, 1980.
19. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
20. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
21. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia lucilliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.

En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



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

Cat 3000G-I,

4.11.02.003.095-Es

Rev 4.0 © Copyright 2023

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE IGG ANTI-ADNn POR INMUNOFLUORESCENCIA

NOTA: Si el laboratorio esta usando un sistema procesador de muestras, el proceso y las recomendaciones del fabricante del sistema procesador deberian ser seguidas. El sistema procesador de slides deberia ser programado para las diluciones apropiadas de las muestras, los volúmenes a dispensar y los tiempos de incubación según se detalla abajo.

- 1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN (PBS)**
Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua desionizada o destilada. El tampón PBS se puede tapar y conservar a 2-25°C durante cuatro semanas como máximo.
- 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTE**
Selección: Disuelva las muestras de paciente a 1:10 añadiendo 0,1 ml (100 µl) de suero a 0,9 ml de PBS reconstituido.
Titulación semicuantitativa: Para preparar series de diluciones dobles de las muestras de selección (p.ej., 1:20, 1:40, 1:80...1:640), saque 0,5 ml de la dilución 1:10 y mézclelo con 0,5 ml de PBS para obtener una dilución 1:20, y así para las sucesivas diluciones.
- 3. DILUCIÓN DEL CONTROL TITULABLE OPCIONAL**
Considere que el control titulable opcional es una muestra de paciente no diluida. Diluya el control a 1:10 añadiendo 0,1 ml (100 µl) del suero de control a 0,9 ml de PBS preparado. Prepare diluciones dobles del control titulable como se ha descrito.
- 4. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS CON SUSTRATO (20-25 µl/pocillo)**
Saque los portaobjetos de las bolsas y disponga los sueros de control en los pocillos de control, como se indica: Invierta el frasco cuentagotas de control y apriete hasta que se vea una gota en la punta. Toque suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entre en contacto directo con la superficie del portaobjetos. Añada una gota (20-25 µl) de muestra de paciente a los pocillos numerados.
PRECAUCIÓN: SI LA PUNTA DEL CUENTAGOTAS TOCA DIRECTAMENTE LA SUPERFICIE DEL PORTAOBJETOS, SE PUEDE DAÑAR EL SUSTRATO DE ANTÍGENO.
- 5. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**
Ponga los portaobjetos en una cámara cubierta y húmeda (bastará con una placa de Petri con una toalla de papel humedecida). Incube con la tapa puesta durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 6. ENJUAGUE CON PBS**
Saque los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y aclárelos brevemente con PBS utilizando una jeringa o una pipeta de Pasteur o serológica. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
NOTA: Para evitar la contaminación cruzada de los portaobjetos con 13 pocillos, dirija el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.
- 7. LAVADO CON PBS (10 minutos)**
Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS.
- 8. REACTIVO FLUORESCENTE PARA DETECTAR ANTICUERPOS**
(cubra los pocillos con 10-12 gotas)
Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérjalos de 3 a 5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante. Vuelva a colocar de inmediato el portaobjetos en la cámara de incubación y cubra los pocillos por completo con el reactivo fluorescente para detectar anticuerpos; empeece por poner una gota en cada pocillo. Repita la operación en cada portaobjetos. El reactivo fluorescente para detectar anticuerpos ha sido titulado para compensar el agua desionizada o destilada residual que queda en el portaobjetos tras el enjuague.
NOTA: Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante este procedimiento, pues se podría dañar el sustrato.
NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN AÑADIR EL REACTIVO.
- 9. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**
Ponga la tapa de la cámara de incubación y cúbrala con una toalla de papel para impedir la exposición a la luz, si la cámara no es opaca. Deje que los portaobjetos se incuben 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 10. ENJUAGUE CON PBS**
Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuáguelos brevemente con PBS. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
- 11. LAVADO CON PBS (10 minutos)**
Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales.
- 12. PREPARACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS**
Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérjalos de 3 a 5 veces en agua desionizada o destilada (Opcional). Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.
NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN PONER EL CUBREOBJETOS. Añada 4-5 gotas de medio de montaje semipermanente en la línea media de cada portaobjetos. Coloque el cubreobjetos con cuidado, evitando que se formen bolsas de aire, haciendo bajar suavemente el cubreobjetos de un lado del portaobjetos al otro.
NOTA: Si pone demasiado medio de preparación puede que la fluorescencia de fondo sea elevada debido a la diseminación de la luz, o que la resolución de las células no sea clara (imagen borrosa). Si ha puesto demasiado medio de preparación, puede retirarlo del portaobjetos secando suavemente el cubreobjetos con papel secante o para lentes, evitando cualquier movimiento directo del cubreobjetos.
- 13. LEER DIAPOSITIVA**
Si la diapositiva debe leerse mediante microscopía fluorescente convencional, puede leerse inmediatamente, mediante el procedimiento estándar del laboratorio. Las diapositivas siempre las debe leer un usuario capacitado que esté familiarizado con la interpretación y los patrones de las secciones de Crithidia luciliae fluorescente. Consulte con el proveedor del microscopio fluorescente las instrucciones de uso del microscopio.

Si se va a leer el portaobjetos con el Image Navigator®, el sistema de microscopía y captura de imagen automatizado de Immuno Concepts, consulte el Manual del operador del sistema de Image Navigator®. El Image Navigator® debe ser operado únicamente por un usuario capacitado.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649
o correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

