



## **SISTEMA DE TESTE FLUORESCENTE PARA IgG ANTI-nDNA**

**Para uso em diagnóstico in vitro  
Para uso profissional**

**USO PREVISTO:** Este sistema de teste é para uso em diagnóstico in vitro para a detecção qualitativa e semiquantificação de anticorpos anti-nDNA da classe IgG em soro humano por microscopia fluorescente manual ou com o microscópio semiautomático de fluorescência Image Navigator®. Este sistema de teste deve ser usado como auxiliar no diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais. Um operador treinado deve confirmar os resultados gerados com o software e dispositivo semiautomático Image Navigator®.

### **RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE**

Os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) podem produzir anticorpos para uma variedade de antígenos nucleares, mas os anticorpos direcionados contra Sm (antígeno Smith) e nDNA mostram a maior correlação com a doença (1). Os anticorpos direcionados contra Sm demonstram padrão de coloração pontilhado de ANA, ao passo que os anticorpos direcionados contra nDNA, em geral, apresentam padrão de coloração homogênea de ANA. Embora os baixos níveis de anticorpos anti-nDNA possam ser presença frequente no soro de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva, dermatomiosite, lúpus eritematoso discoide e doença mista do tecido conjuntivo (2), os altos níveis de anticorpos anti-nDNA são vistos quase exclusivamente no LES. Acredita-se que os anticorpos contra nDNA estão envolvidos na patogênese das variantes mais graves de LES, quando se depositam como complexos imunes (3). Os anticorpos anti-nDNA ocorrem em altos títulos e, como se correlacionam com a atividade da doença (4), sua detecção é importante no tratamento dos pacientes com LES.

Existem diversos ensaios para a detecção de anticorpos anti-nDNA. Os métodos mais usados incluem imunofluorescência indireta, radioimunoensaio, contra-imunoeletoforese e imunodifusão (5-8). O sistema de teste para IgG anti-nDNA da Immuno Concepts é um método de anticorpo fluorescente indireto (IFA). O anticorpo sérico reativo para nDNA é detectado por coloração do cinetoplasto no interior do organismo *Crithidia luciliae* (9). *C. luciliae* é um parasita da mosca varejeira e não é patogênico para o ser humano. O cinetoplasto desses hemoflagelados é parte de uma grande mitocôndria na qual o nDNA helicoidal está concentrado (9-10). Na eletromicrografia, o cinetoplasto aparece como uma estrutura ligeiramente côncava, em forma de disco, que contém cristas mitocondriais e uma massa fibrosa de DNA (11). O cinetoplasto é encontrado entre o núcleo de localização central e o corpo basal do flagelo. Como o nDNA do cinetoplasto não contém contaminantes de DNA de cadeia única (ssDNA), os possíveis problemas de reações falso-positivas de ssDNA, que ocorrem no radioimunoensaio com DNA de timo de bezerro, são praticamente eliminados (12-16).

### **PRINCÍPIO DO TESTE**

O teste para IgG anti-nDNA da Immuno Concepts usa a técnica de anticorpo fluorescente indireto descrita pela primeira vez por Weller e Coons (17). As amostras do paciente são incubadas com substrato antigênico para permitir a ligação específica de autoanticorpos ao nDNA do cinetoplasto. Se os anticorpos anti-nDNA estiverem presentes, forma-se um complexo antígeno-anticorpo estável. Depois de lavar para remover os anticorpos não-específicos, o substrato é incubado com reagente para anticorpo anti-humano conjugado à fluoresceína. Quando os resultados são positivos, ocorre a formação de um complexo estável de três partes, consistindo em anticorpo fluorescente ligado ao anti-DNA humano, que é ligado ao antígeno n-DNA. Esse complexo pode ser visualizado com o auxílio de um microscópio fluorescente. Nas amostras positivas, o cinetoplasto ou o cinetoplasto e o núcleo mostram fluorescência amarelo esverdeado brilhante no

interior dos organismos *Crithidia luciliae*. Se a amostra for negativa para IgG anti-nDNA, o cinetoplasto não apresentará fluorescência.

## COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

**Uso:** Todos os componentes vêm prontos para uso, sem necessidade de compor alíquotas ou de reconstituição (exceto para o tampão PBS que deve ser dissolvido em água desionizada ou destilada antes do uso).

**Armazenamento:** Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2°C a 10°C. Depois da reconstituição, o reagente tampão PBS deve ser armazenado em recipientes com tampa de rosca e armazenar de 2 °C a 25 °C.

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

### REAGENTES REATIVOS

**Lâminas de substrato [SLIDE]:** Nº de catálogo 3007, 3014. Lâminas de substrato de nDNA que usam *Crithidia luciliae* estabilizado diretamente nos poços de teste. O modelo único de lâmina com fossos minimiza a contaminação cruzada dos poços durante o teste. A bolsa da lâmina é cheia com um gás inerte não-tóxico que contribui para a estabilidade das células.

**Controle positivo homogêneo [CONTROL+]:** Nº de Catálogo 3021. Frasco conta-gotas pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano positivo de controle com anticorpo específico para antígenos nDNA. Este soro mostra reação com coloração positiva brilhante no cinetoplasto no substrato de *Crithidia luciliae* da Immuno Concepts.

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

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

**Reagente para anticorpo fluorescente [CONJ|FITC]:** Nº de Catálogo 3009G (9,0 ml), 3075G (23 ml). IgG anti-humana (cadeia gama específica) conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC). O reagente vem pronto para uso, em frascos conta-gotas de 9,0 ml para cada 10 lâminas no kit completo de teste.

### COMPONENTES NÃO-REATIVOS

**Tampão PBS em pó [PWDR|PBS]:** Nº de Catálogo 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. (É fornecida uma bolsa de pó de tampão para cada cinco lâminas nos kits completos de teste.)

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

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

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

## MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetas volumétricas para dispensar volumes de 20 a 25 µl  
Jarras de Coplin ou placas de coloração  
Almotolia ou pipetas Pasteur  
Pipetas sorológicas  
Água desionizada e destilada  
Tubos de ensaio para preparar diluições de soro  
Papel absorvente ou papel-toalha  
Luvas descartáveis  
Recipientes de um litro com tampa de rosca (para o tampão PBS)  
Temporizador de laboratório

Microscópio fluorescente equipado com filtro excitador de 495 nm e filtro de barreira de 515 nm  
Placa de Petri ou outra câmara para incubação

## PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados na preparação de controles para este produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os soros de controle devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas no nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
4. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
5. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
6. Em caso de se utilizar soro hemolisado ou lipêmico, aquecer o soro inativado por 30 minutos até 56 °C para obter resultados ideais. O soro contaminado por micróbios não deve ser usado.
7. O soro de controle titulável destina-se ao uso na monitoração da reprodutibilidade de cada lote e de cada execução. Não se destina como medidor da sensibilidade ou especificidade gerais do ensaio.
8. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
9. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
10. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados falsos.
11. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
12. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.
13. Deixar todos os reagentes, lâminas e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar.
14. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
15. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
16. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida em quantidade abundante de água.

## COLETA DE AMOSTRA

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

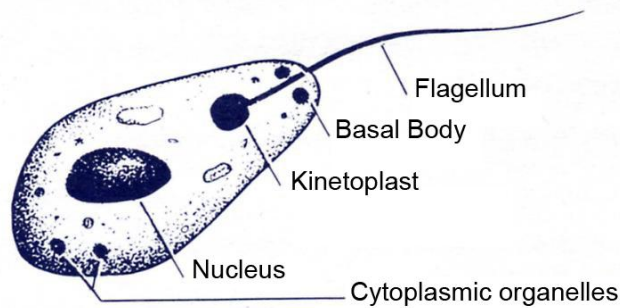
**Substâncias interferentes:** O soro que apresenta alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser usado porque essas condições podem ocasionar resultados falsos. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

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

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

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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



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

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

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

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

### CONTROLE DE QUALIDADE

Controles positivos, negativos e do tampão fosfato salino devem ser testados a cada execução. O controle positivo deve mostrar fluorescência amarelo esverdeado brilhante no cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, com ou sem coloração do núcleo. O controle negativo não apresentará coloração do cinetoplasto. O controle PBS é usado para observar coloração não-específica do reagente de anticorpo, e não deve apresentar fluorescência verde. Se os controles não aparecerem conforme a descrição, o teste é inválido e deve ser repetido.

### CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

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

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

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

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

1. Tipo de fonte de luz usada. As fontes de luz de mercúrio produzem maior energia de excitação a 495 nm do que o quartzo ou halogênio. As fontes de luz de mercúrio de 50 watts, 100 watts e 200 watts diferem um pouco quanto à energia de excitação a 495 nm. As fontes de luz de quartzo ou halogênio de 100 watts produzem maior energia de excitação a 495 nm que as mesmas fontes de 50 watts.
2. Condição e tempo de uso da fonte de luz. Isso é particularmente verdadeiro para as fontes de luz de mercúrio, que em geral, apresentam redução gradual da energia de excitação a 495 nm antes de queimar. Essa redução gradual da energia de excitação pode resultar em perda significativa de sensibilidade durante várias semanas. Esse problema é evitado mantendo-se um registro de tempo de uso. Para obter melhores resultados, deve-se trocar as lâmpadas de mercúrio de 50 watts depois de 100 horas de uso, e as lâmpadas de mercúrio de 100 ou 200 watts, depois de 200 horas. As fontes de luz de quartzo e halogênio em geral, não apresentam redução gradual da energia de excitação antes de queimar.
3. Tipo de filtro excitador usado. Os filtros excitadores de interferência fornecem mais sensibilidade em comprimento de onda muito mais estreito do que os filtros excitadores de absorção. Consultar o manual do microscópio ou o representante de vendas para obter mais informações.
4. Alinhamento adequado da via de luz do microscópio. Consultar as instruções do manual do microscópio fluorescente.
5. Abertura numérica da objetiva. Com a luz fluorescente incidente (Epi), a fluorescência aumenta de maneira exponencial, pois a abertura numérica (NA) da objetiva aumenta ainda mais. Isso pode causar objetiva de 40X, com NA de 0,65 para ler uma ou mais diluições inferiores a objetiva de 40X com NA de 0,85. A abertura numérica está marcada ao lado da objetiva.
6. Filtros de supressão. Os filtros de supressão reduzem os comprimentos de onda específicos de excitação e podem ser usados na redução da sensibilidade. Consultar o manual do microscópio ou o representante de vendas para obter mais informações.
7. Precisão e exatidão da técnica de diluição, do equipamento e do desempenho dos procedimentos do teste.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

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

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

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

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

## INTENSIDADE FLUORESCENTE

A intensidade fluorescente pode ser semiquantitativa seguindo-se as orientações dos reagentes para anticorpo fluorescente, estabelecidas pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA, em Atlanta, Geórgia.

- 4+ Amarelo esverdeado brilhante (fluorescência máxima)
- 3+ Fluorescência amarelo esverdeado menos brilhante
- 2+ Padrão celular definido, mas fluorescência esmaecida
- 1+ Fluorescência de pouquíssima intensidade

Existe uma lâmina padrão para a determinação dessas intensidades fluorescentes, FITC QC Slide™, número de catálogo 1900, da Immuno Concepts, N.A., Ltd.

## LAUDO DE RESULTADOS

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

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

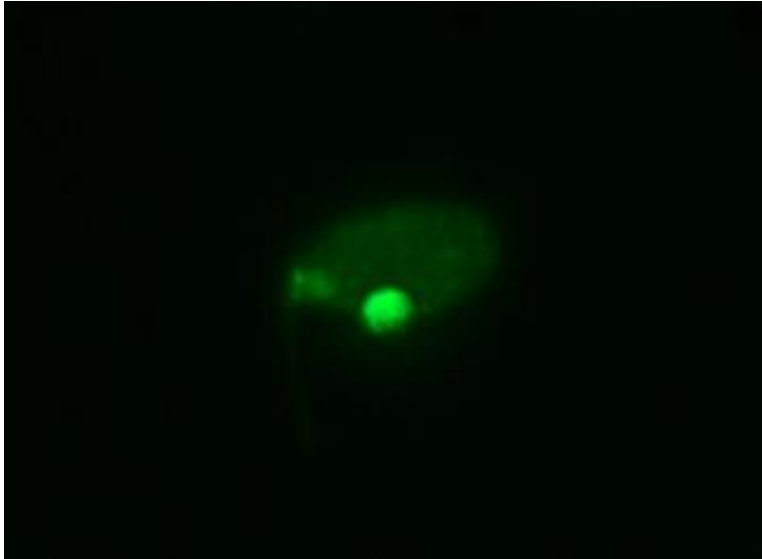
## CARACTERÍSTICAS DA COLORAÇÃO

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

*Resultado:* Positivo para anticorpos anti-nDNA.

*Antígenos:* nDNA.

*Associação com doenças:* Os títulos altos são sugestivos de LES (1) ou, no caso de LES já diagnosticado, de doença recidivante ou ainda, de falta de resposta à terapia (2-4).



**As imagens para coloração do Núcleo, Corpo Basal e Flagelo representam coloração considerada negativa para anticorpos anti-nDNA.**

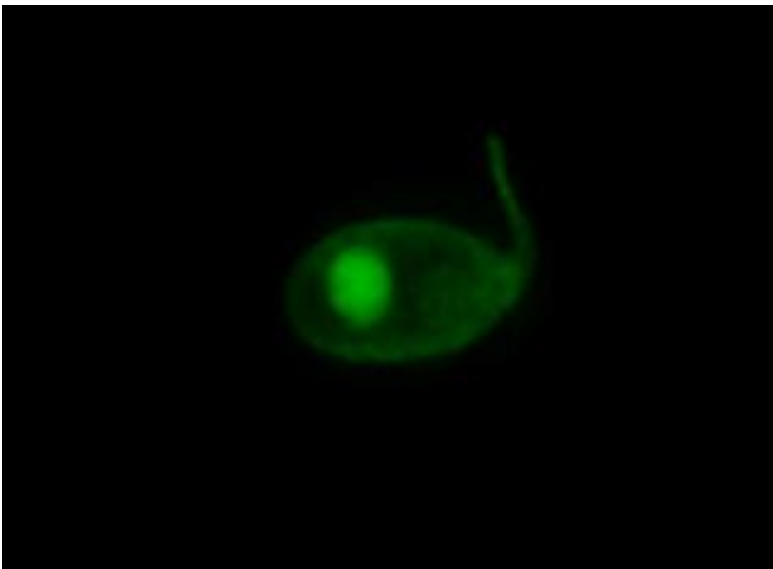
**Núcleo:** Coloração leve, periférica ou pontilhada do núcleo.

*Resultado:* Negativo para anticorpos anti-nDNA.

*Antígenos:* Antígenos nucleares associados (2-4).

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

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



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

*Sinônimos:* Cinetossomo.

*Resultados:* Negativo para anticorpos anti-nDNA.

*Antígenos:* Antígenos associados ao corpo basal.

*Associação com doenças:* Relatados nos pacientes com LES que não apresentam coloração do cinetoplasto ou do núcleo (18).



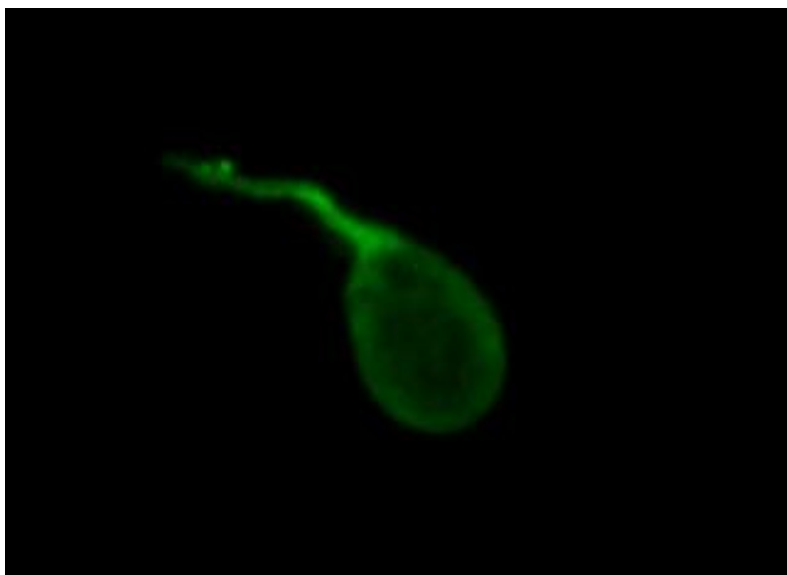
**Flagelo:** Coloração do flagelo do organismo.

*Sinônimos:* Região da cauda do organismo.

*Resultado:* Negativo para anticorpos anti-nDNA.

*Antígenos:* Antígenos associados ao flagelo desconhecidos.

*Associação com doenças:* Desconhecida.



## LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpos anti-DNA. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos anti-nDNA. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Certas medicações, inclusive procainamida e hidralazina, podem induzir doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico. Os pacientes com LE induzido por medicação podem ser positivos para ANAs comumente direcionados contra as histonas nucleares, embora o anticorpo anti-nDNA também tenha sido relatado (19-20).

- Embora o anti-nDNA de alto título possa ser bastante sugestivo de LES, não se pode considerá-lo diagnóstico, mas sim, visto como parte da história clínica geral de um paciente. Os baixos títulos de anticorpos anti-nDNA em geral estão presentes no soro de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva, dermatomiosite, lúpus eritematoso sistêmico e doença mista do tecido conectivo (2).
- Como existem muitas opções de microscópios fluorescentes, recomenda-se que as fontes de luz, filtros e a óptica sejam padronizados ao comparar os títulos de pacientes entre laboratórios.
- Os pacientes que recebem tratamento com esteroides podem ter resultados negativos para anticorpo anti-nDNA (21).

## VALORES ESPERADOS

O valor esperado na população normal é negativo na diluição de seleção de 1:10. Certos medicamentos, como hidralazina, podem induzir produção de anticorpo anti-nDNA (19-20).

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema de teste fluorescente para IgG Anti-nDNA da Immuno Concepts foi comparado com outro sistema de teste fluorescente para IgG anti-nDNA encontrado no comércio. A população estudada consistiu em 121 amostras que foram submetidas a análises clínicas para teste de anti-nDNA, 100 doadores de sangue, e 2 padrões da OMS que sabidamente contêm anticorpos anti-nDNA. Todas as amostras foram testadas em paralelo no dispositivo legalmente comercializado e o dispositivo proposto. Com base nessa comparação, foram obtidos os seguintes dados:

		Dispositivo legalmente comercializado Teste de IgG anti-nDNA	
		Positivo	Negativo
Immuno Concepts IgG anti-nDNA	Positivo	28	0
	Negativo	2	193

Esses dados fornecem as seguintes estatísticas: concordância percentual positiva, 93,3% (28/30) [77,6 – 99,2%]; concordância percentual negativa, 100%, (193/193) [97,7 – 100,0%]; concordância geral, 99,1%, (221/223) [96,6 – 100,0%].

Uma de duas amostras “falso-negativas” foi negativa para anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta, usando células HEp-2, e não satisfaria os critérios de triagem para teste anti-nDNA na maioria dos laboratórios clínicos.

### REPRODUTIBILIDADE DO TÍTULO

Para determinar a reprodutibilidade intraensaio, um único soro positivo para anti-nDNA foi testado em 30 replicações por um único técnico em uma só execução. Os valores mediano e modal para esses dados foram 1:160, com coeficiente geométrico de variação de 0,78%. A variabilidade entre ensaios foi determinada pelo exame dos valores dos títulos para um único soro positivo para anti-nDNA executado em 15 diferentes lotes de kits. Os valores mediano e modal para esses dados também foram 1:160, com coeficiente geométrico de variação de 82%. Tanto nos testes entre ensaios como nos intraensaio, todos os valores dos títulos caíram dentro de mais ou menos uma diluição da mediana.

### USE COM O IMAGE NAVIGATOR®

O Image Navigator® é o sistema de microscópio semiautomático da Immuno Concepts para leitura de lâminas fluorescentes de nDNA. Em uma comparação do Image Navigator® com a leitura convencional de lâminas fluorescentes de *Crithidia luciliae*, foram obtidos os seguintes dados:

Lâminas de substrato de *Crithidia luciliae* (n=479):

Concordância positiva: 100,0% (55/55) [92,2 – 100,0%]

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

Concordância do ponto final do título: 100,0% (55/55) [92,2 - 100,0%]

Uma coorte de 172 amostras foi obtida de pacientes previamente diagnosticados com LES. Todas as amostras foram testadas usando lâminas de substrato de *Crithidia luciliae* da Immuno Concepts. Nesta população selecionada, a sensibilidade diagnóstica percentual clínica para LES foi de 30,2% [23,8 - 37,5%] para microscopia fluorescente convencional e 30,2% [23,8 - 37,5%] para leituras do monitor Image Navigator®.

Uma coorte de 307 amostras foi obtida de pacientes com outras doenças além do LES. A especificidade clínica foi de 99,0% [97,0 – 99,8%] para microscopia fluorescente convencional e 99,0% [97,0 – 99,8%] para leituras do monitor Image Navigator®.



# BIBLIOGRAFIA

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 luciliae* 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 luciliae*, 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 luciliae* 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 luciliae* 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 luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.

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



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



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

Cat 3000G-I,

4.11.02.003.095-Pt

Rev 4.0 © Copyright 2023

# PROCEDIMENTO DO TESTE FLUORESCENTE PARA IGG ANTI-NDNA

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

## 1. RECONSTITUIÇÃO DE TAMPÃO (PBS)

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

## 2. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE

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

## 3. DILUIÇÃO DE CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

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

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

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

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

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

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

## 6. ENXÁGUE COM PBS

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

**NOTA:** Para evitar a contaminação cruzada nas lâminas de 13 poços, direcionar o jato de PBS ao longo da linha média da lâmina, inclinando primeiro na direção dos poços 1-5, seguindo-se a inclinação para os poços 6-10.

## 7. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)

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

## 8. REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE (Cobrir os poços com 10 a 12 gotas)

Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada. Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. Devolver a lâmina imediatamente para a câmara de incubação e cobrir os poços completamente, usando reagente de anticorpo fluorescente; começar

colocando uma gota sobre cada poço. Repetir para cada lâmina. O reagente de anticorpo fluorescente foi titulado para compensar o resíduo de água desionizada ou destilada na lâmina depois do enxágue.

**NOTA:** É importante que os poços de lâminas não sequem durante esse procedimento e que não ocorra dano ao substrato.  
**NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE FORMA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.**

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

Colocar a tampa na câmara de incubação e cobrir com papel-toalha para evitar exposição à luz, se a câmara não for opaca. Deixar a(s) lâmina(s) incubar por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C).

## 10. ENXÁGUE COM PBS

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

## 11. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)

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

## 12. COLOCAÇÃO DA LAMÍNULA

Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada (Opcional). Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. **NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE FORMA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM LAMÍNULA POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.** Adicionar 4 a 5 gotas de meio de montagem semipermanente ao longo da linha média de cada lâmina. Colocar a lamínula cuidadosamente na posição, evitando bolsas de ar, abaixando suavemente a lamínula de uma extremidade da lâmina para a outra.

**NOTA:** O excesso de meio de montagem na lâmina pode resultar em alta fluorescência de fundo, devido à dispersão da luz ou em falta de boa resolução das células (imagem borrada). O excesso de meio de montagem deve ser removido suavemente colocando-se a lamínula em papel absorvente enquanto se evita qualquer movimento direto.

## 13. LEIA A LÂMINA

Se a lâmina for lida usando microscopia fluorescente convencional, ela pode ser lida imediatamente usando o procedimento padrão do laboratório. As lâminas sempre devem ser lidas por um usuário treinado que esteja familiarizado com a interpretação de *Crithidia luciliae* fluorescente. Consulte o fornecedor do microscópio fluorescente para instruções para uso do microscópio.

Se a lâmina for lida usando o Image Navigator<sup>®</sup>, o microscópio automatizado e o sistema de captura de imagem da Immuno Concepts, consulte o manual do operador para o sistema do Image Navigator<sup>®</sup>. O Image Navigator<sup>®</sup> deve ser operado apenas por usuário treinado.

## PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649

Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

