



## **IgG ANTI-nDNA FLUORESCERANDE TESTSYSTEM**

**För diagnostisk användning IN VITRO**  
**För yrkesmässigt bruk**

**AVSEDD ANVÄNDNING:** Detta testsystem är avsett för in vitro-diagnostik för kvalitativ detektering och semikvantifiering av anti-nDNA-antikroppar av IgG-klassen i humant serum genom manuell fluorescensmikroskopi eller med Image Navigator® Fluorescence Semiautomated Microscope. Detta testsystem ska användas som ett hjälpmedel vid diagnos av systemisk lupus erythematosus (SLE) i samband med andra kliniska fynd och laboratoriefynd. En utbildad operatör måste bekräfta resultat som genererats med Image Navigator® halvautomatiska enhet och programvara.

### **SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET**

Patienter med systemisk lupus erythematosus (SLE) 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 (1). Antikroppar 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 syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyositis, skivformig lupus erythematosus och blandad bindvävssjukdom (2) kan ha låga anti-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 (3). Antikroppar mot nDNA förekommer med hög antikroppnivå, och eftersom de är associerade med sjukdomens aktivitet (4) är det viktigt att de upptäcks för behandlingen av SLE-patienter.

Flera analyser finns tillgängliga för detektering av anti-nDNA-antikroppar. Följande metoder används mest: Indirekt immunfluorescens, radioimmunanalys, kontraimmunelektrofores samt immundiffusion (5-8). Immuno Concepts IgG anti-nDNA-testsystem är en indirekt fluorescerande antikroppsmetod (IFA). Serumantikropp, reaktiv mot nDNA, detekteras genom att kinetoplasten inuti organismen *Crithidia lucillae* färgas (9). *C. lucillae* är en parasit på spyflugan och är inte patogen för människor. Dessa hemoflagellaters kinetoplast är en del av den stora mitokondrie, i vilken spiralformad nDNA är koncentrerad (9-10). På elektronmikrografier syns kinetoplasten som en något konkav skivformad struktur innehållande mitokondriskrista och en fibrös DNA-massa (11). 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 falsk-positiva reaktioner på ssDNA, vilket kan förekomma vid DNA-radioimmunanalys på kalvbräss (12-16).

### **TESTPRINCIP**

Immuno Concepts IgG anti-nDNA-test använder den indirekta fluorescerande antikropptechnik som först beskrivits av Weller och Coons (17). Patientproverna odlas med antigensubstrat för att tillåta specifik bindning av autoantikroppar mot kinetoplast-nDNA. Om det förekommer anti-nDNA-antikroppar, bildas ett stabilt antigen-antikroppkomplex. Efter tvättning för att avlägsna ospecifika antikroppar odlas substratet med en antihuman antikroppreagens konjugerad med fluorescein. Om resultaten är positiva bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en fluorescerande antikropp bunden till en human anti-nDNA-antikropp, som i sin tur är bunden till en nDNA-antigen. Detta komplex kan studeras i fluorescerande mikroskop. I positiva prover uppvisar kinetoplasten eller kinetoplasten och kärnan en klar äppelgrön fluorescens inuti organismerna *Crithidia lucillae*. Om provet är negativt för IgG anti-nDNA-antikroppar uppvisar kinetoplasten ingen fluorescens.

## SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM INGÅR

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

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

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

### REAKTIVA REAGENSER

**Objektglas för substrat [SLIDE]:** Katalognummer 3007, 3014. nDNA-substratobjektglas med *Crithidia luciliae* stabiliserade direkt på testbrunnarna. Det unika vallgravsformade objektglaset minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspåsen är fylld med en stabil giftfri gas som bidrar till cellernas stabilitet.

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

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

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

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

### ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

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

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

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

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

## YTTERLIGARE MATERIAL SOM BEHÖVS - MEDFÖLJER EJ

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

## FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

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

## PROVTAGNING

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

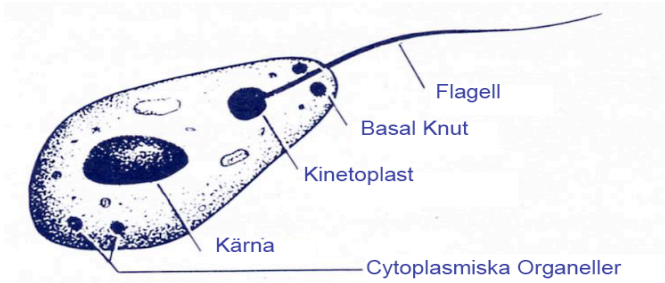
**Störande substanser:** Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi, eller mikrobiell tillväxt bör inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till felaktiga resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före testning.

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

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

## TOLKNING AV RESULTAT

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



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

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

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

**AVLÅS 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 ljus äppelgrön fluorescens i *Crithidia luciliae*-kinetoplasten, med eller utan färgning av kärnan. Den negativa kontrollen uppvisar ingen färgning av kinetoplasten. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av antikroppreagensen och bör inte uppvisa någon grön fluorescens. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

### **TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL**

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

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

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll med användning av Immuno Concepts IgG anti-nDNA-fluorescerande testsystem har ett medelantikroppvärde etablerats för varje lotnummer. Lotnumret och antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde för ( $\pm$  en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) finns angiven på flaskans etikett och skall användas som vägledning för testsystemets prestanda.

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

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

## TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

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

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

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

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

## FLUORESCENSENS INTENSITET

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

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

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

## RESULTATRAPPORTERING

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

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

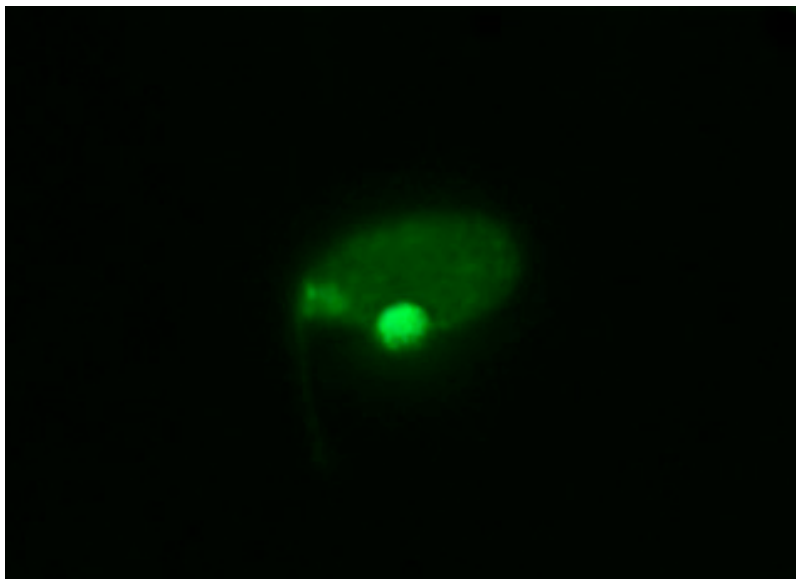
### FÄRGNINGSKARAKTÄRISTIK

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

*Resultat:* Positiv för antikroppar mot nDNA.

*Antigener:* nDNA.

*Sjukdomssamband:* Höga antikroppnivåer tyder på aktiv SLE (1), eller vid tidigare diagnostiserad SLE, återkommande sjukdom eller bristande respons på behandling (2-4).



Bilder för färgning av kärnan, basalkroppen och flagellum representerar färgning som anses negativ för anti-nDNA-antikroppar.

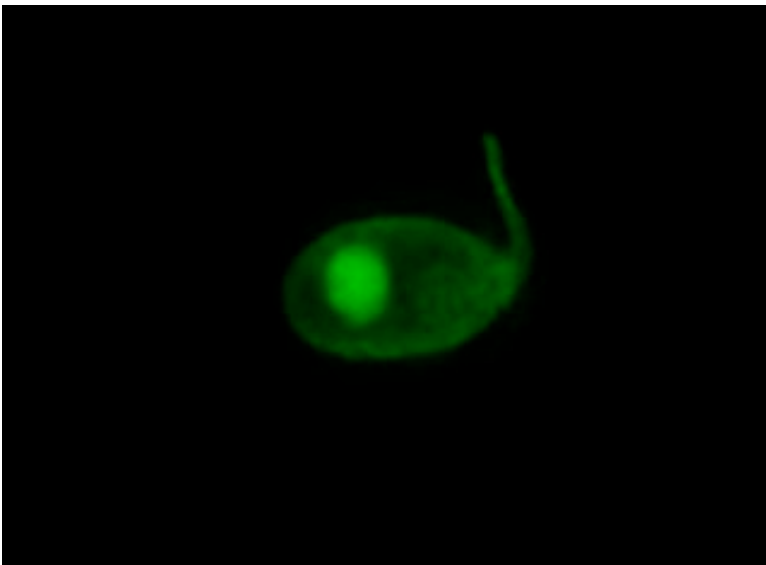
**Kärna:** En jämn, perifer, eller fläckig färgning av kärnan.

*Resultat:* Negativ för antikroppar mot nDNA.

*Antigener:* Nukleärassocierade antigener (2-4).

*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*.



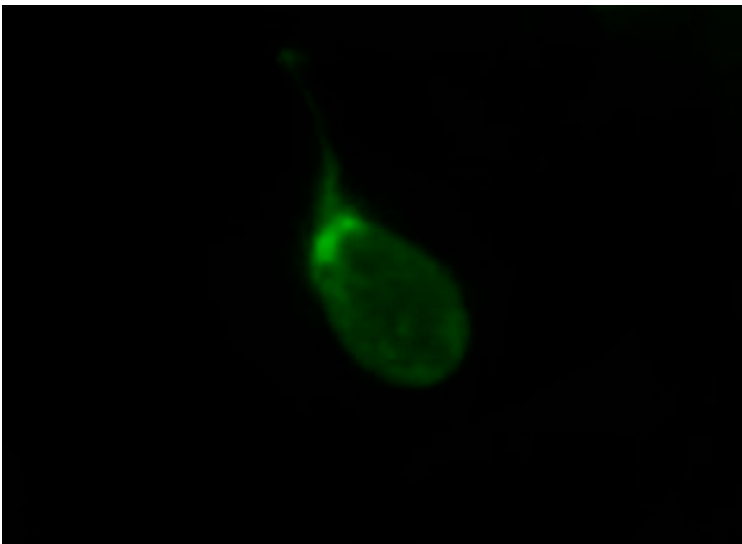
**Basala knutar:** En jämn färgning av de båda områden som är belägna där organismknuten ansluter till flagellen i ektoplasman.

*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 (18).



**Flagell:** Färgning av organismens flagell.

*Synonymer:* Organismens svansområde.

*Resultat:* Negativ för antikroppar mot nDNA.

*Antigener:* Okända flagellassocierade antigener.

*Sjukdomssamband:* Okänt.



## TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av detektion av anti nDNA-antikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens historia och symptom, de fysiska upptäckterna och övriga diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för anti nDNA-antikroppar. Kliniska symptom, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, inklusive procainamid och hydralazin, kan orsaka en lupus erytematos-liknande sjukdom. Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa positiva antinukleära antikroppar, vilka i allmänhet är riktade mot nukleära histoner, även om antikropp till nDNA också har rapporterats (19-20).
4. Även om en högt titrerad nDNA i hög grad kan tyda på SLE, bör detta inte betraktas diagnostiskt, utan snarare ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria. Låga nDNA-antikroppnivåer är ofta fallet med sera hos patienter med reumatoid artrit, Sjögrens syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erytematosus och blandad bindvävssjukdom (2).
5. Då det finns många olika alternativ att tillgå vad gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas att ljuskällor, filter och optik standardiseras, när man jämför patienters antikroppnivåer mellan laboratorier.
6. Patienter under steroidbehandling kan uppvisa negativa resultat för nDNA-antikropp (21).

## FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det förväntade värdet i den normala populationen är negativt i screeningspåddning 1:10. Vissa läkemedel, t ex hydralazin, kan medföra produktion av nDNA-antikroppar (19-20).

## PRESTANDA

Immuno Concepts IgG anti-nDNA-fluorescerande testsystem jämfördes med ett annat IgG anti-nDNA-fluorescerande testsystem som finns på marknaden. Den studerade populationen utgjordes av 121 prover som överlämnades till kliniska laboratorier för analys av anti-nDNA, 100 bloddonatorer och två WHO-standarder som är kända för att innehålla anti-nDNA-antikroppar. Alla prover testades parallellt på prediktionsutrustningen och patientutrustningen. Följande data erhöles med utgångspunkt från denna jämförelse:

		Prediktion	
		IgG anti-nDNA Test	
Immuno Concepts IgG anti-nDNA	Positiv	28	0
	Negativ	2	193

Dessa data ger följande statistik: positiv procentuell överensstämmelse, 93,3 % (28/30) [77,6 – 99,2 %]; negativ procentuell överensstämmelse, 100 %, (193/193) [97,7 – 100,0 %] ; övergripande överensstämmelse, 99,1 %, (221/223) [96,6 – 100,0 %].

Ett av de båda falskt negativa proverna var negativt för antinukleära antikroppar med indirekt fluorescens med hjälp av HEp-2-celler och skulle inte ha uppfyllt screeningkriteriet för anti-nDNA-analys i de flesta laboratorier.

#### **ANTIKROPPNIVÅS REPRODUCERBARHET**

För att fastställa intraanalysens reproducerbarhet testades ett och samma anti-nDNA-positiva serum i 30 replikat av en och samma tekniker i en enda serie. Median- och lägesvärdena för dessa data var 1:160 med en geometrisk variationskoefficient på 0,78%. Interanalysvariabiliteten fastställdes genom att studera antikroppnivåvärden för ett enda anti-nDNA-positivt serum, när detta kördes i femton olika satsloter. Median- och lägesvärdena för dessa data var också 1:160 med en geometrisk variationskoefficient på 0,82%. I både interanalys- och intraanalytesterna hamnade alla antikroppnivåvärden inom plus eller minus en medianspädning.

#### **ANVÄND MED IMAGE NAVIGATOR®**

Image Navigator® är Immuno Concepts halvautomatiska mikroskopsystem för att läsa av de fluorescerande nDNA-objektglasen. Vid en jämförelse av Image Navigator® med konventionell avläsning av fluorescerande Crithidia luciliae-objektglas erhöles följande data:

Crithidia luciliae substratglas (n=479):

Positiv överenskommelse: 100,0 % (55/55) [92,2 – 100,0 %]

Negativ överenskommelse: 100,0 % (424/424) [98,9 – 100,0 %]

Titer endpoint-överensstämmelse: 100,0 % (55/55) [92,2 – 100,0 %]

En kohort av 172 prover erhöles från patienter som tidigare hade diagnostiserats med SLE. Alla prover testades med användning av Immuno Concepts Crithidia luciliae substratobjektglas. I denna utvalda population var klinisk procentuell diagnostisk känslighet för SLE 30,2 % [23,8 - 37,5 %] för konventionell fluorescensmikroskopi och 30,2 % [23,8 - 37,5 %] för Image Navigator®-monitoravläsningar.

En kohort av 307 prover erhöles från patienter med andra sjukdomar än SLE. Klinisk specificitet var 99,0 % [97,0 – 99,8 %] för konventionell fluorescensmikroskopi och 99,0 % [97,0 – 99,8 %] för Image Navigator®-monitoravläsningar.



# BIBLIOGRAFI

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.

**Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsöpackningen 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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 3000G-I,

4.11.02.003.095-Sv

Rev 4.0 © Copyright 2023

# IGG ANTI-NDNA FLUORESCERANDE TESTPROCEDUR

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

- 1. REKONSTITUTION AV BUFFERT (PBS)**  
Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. PBS-bufferten kan täckas och förvaras i 2-25°C i maximalt fyra veckor.
- 2. SPÄDNING AV PATIENTPROV**  
Screening: Späd patientprovet till 1:10 genom att tillsätta 0,1 ml (100 µl) serum till 0,9 ml rekonstituerad PBS.  
Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: För att framställa dubbla seriespädningar av screeningprov (t ex 1:20, 1:40, 1:80...1:640), avlägsna 0,5 ml av spädningen 1:10 och blanda med 0,5 ml av PBS för att uppnå spädningen 1:20. Fortsätt därefter med seriespädningarna på detta sätt.
- 3. SPÄDNING AV TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL**  
Behandla den tillhörande titrerbara kontrollen som ett ospädd patientprov. Späd kontrollen 1:10 genom att tillsätta 0,1 ml (100 µl) kontrollserum i 0,9 ml rekonstituerad PBS. Framställ dubbla spädningar av den titrerbara kontrollen (se skiss ovan).
- 4. IORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (20-25 µl/brunn)**  
Avlägsna objektglaset/objektglaset från påsen/påsarna och placera kontrollsera på kontrollserabrunnarna enligt följande: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen till rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) patientprov i de nummerade brunnarna.  
**VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.**
- 5. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)**  
Placera objektglaset/-n i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk duger). Odlas, med locket på, i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 6. PBS-SKÖLJNING**  
Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprutflaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.  
**OBSERVERA:** Led PBS-flödet längs objektglasets mittlinje för att undvika korskontamination på trettonbrunnars objektglas genom att först luta glaset mot brunnarna 1-5 och därefter mot brunnarna 6-10.
- 7. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**  
Tvätta objektglaset/-n under tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.
- 8. FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS (täck brunnarna med 10-12 droppar)**  
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför omedelbart objektglaset till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med fluorescerande antikroppreagens. Börja med att placera en droppe i varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Den fluorescerande antikroppreagens har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som finns kvar på objektglaset efter sköljning.  
**OBSERVERA:** Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar under detta förfarande, annars tar substratet skada.  
**TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.**
- 9. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)**  
Placera locket på inkubationskammaren och täck med en pappershandduk för att förhindra att det utsätts för ljus, om kammaren inte är ogenomskinlig. Odlas objektglaset/-n i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 10. PBS-SKÖLJNING**  
Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- 11. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**  
Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas.
- 12. MONTERING AV SKYDDSREMSEA**  
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten (Valfri). Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten.  
**TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT DET ALDRIG STÅ UTAN SKYDDSREMSEA LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.** Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från objektglasets ena ände till den andra.  
**OBSERVERA:** Överflödigt monteringsmedium på objektglaset kan leda till hög bakgrundsfluorescens på grund av ljusspridning, eller brist på tydlig upplösning av celler (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan.
- 13. AVLÄSA OBJEKTGLAS**  
Om objektglaset ska avläsas med hjälp av konventionell fluorescerande mikroskopi kan den läsas av direkt genom att använda laboratoriets standardförfarande. Objektglaset måste alltid avläsas av en utbildad användare som är bekant med tolkning av fluorescerande Crithidia luciliae. Kontakta leverantören av det fluorescerande mikroskopet för användarinstruktioner för mikroskopet.  
Om skivan som ska läsas med hjälp av Image Navigator®, Immuno Concepts automatiska mikroskopi och bildtagningssystem så ska du läsa användarhandboken för Image Navigator®-systemet. Image Navigator® får endast användas av en utbildad användare.

**TEKNISK HJÄLP:** +1-916-363-2649  
eller e-mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

