



Istruzioni per l'uso

Valide a partire dal 17.10.2025

AKLIDES® nDNA



Saggio di immunofluorescenza indiretta
per la determinazione di anticorpi IgG nel siero
umano contro il DNA nativo



Mediphan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germania

Telefono: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25

info@mediphan.de
www.mediphan.de



1 Destinazione d'uso

L'AKLIDES® nDNA è un saggio di immunofluorescenza (IFI) per la determinazione qualitativa degli anticorpi IgG nel siero umano contro il DNA nativo a doppio filamento sugli emoflagellati di *Crithidia lucilliae*.

L'AKLIDES® nDNA è inteso come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico (LES) insieme ad altri risultati clinici e di laboratorio.

L'immunodosaggio è progettato per l'elaborazione manuale e la generazione automatizzata di immagini utilizzando il sistema AKLIDES® o akiron®.

L'immunodosaggio è stato progettato solo per uso professionale nella diagnostica *in vitro*.

2 Rilevanza diagnostica

Malattie autoimmuni sistemiche, come la lupus eritematoso sistemico (LES) sono caratterizzate dalla comparsa di una varietà di autoanticorpi diretti contro componenti cellulari del nucleo o del plasma. Sebbene significato e rilevanza patologica di alcuni anticorpi non siano state ancora completamente rivelati, la determinazione di autoanticorpi è ampiamente stabilita e svolge un ruolo importante nella diagnostica di malattie autoimmuni sistemiche.

Il LES ha un'eziologia sconosciuta ed è caratterizzata da una patologia multiorgano. LES ha una predominanza femminile. L'insorgenza della malattia si verifica di solito durante l'età fertile. Gli anticorpi anti-DNA nativo a doppio filamento sono il segno distintivo per la diagnosi della LES e sono inclusi nei criteri diagnostici dell'American College of Rheumatology per LES.

Per la rilevazione di anticorpi anti DNA nativo in immunofluorescenza può essere utilizzato l'emoflagello *Crithidia lucilliae*. Questi microrganismi contengono uno speciale organo utilizzato come serbatoio per DNA nativo, il cinetoplasto. Una colorazione fluorescente del cinetoplasto indica la presenza di anticorpi contro il DNA nativo, con una specificità molto elevata. Uno speciale diluente per il campione viene utilizzato per aumentare la sensibilità del saggio rispetto ad uno convenzionale.

3 Principio del saggio

L'IFI (immunofluorescenza indiretta) è un immunodosaggio per la determinazione di anticorpi specifici. Cellule contenenti l'antigene d'interesse vengono immobilizzate su vetrino portaoggetto. Se nel campione del paziente sono presenti anticorpi specifici, questi si legano all'antigene nella cellula. Un anticorpo secondario coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) rileva l'immunocomplesso generato. I portaoggetti vengono esaminati con un microscopio a fluorescenza. Una colorazione fluorescente specifica dimostra la presenza di anticorpi specifici nel campione del paziente.

4 Componenti del saggio

Componente 60 (120) Determinazioni	Descrizione
Portaoggetto con substrato A SLIDE X 10 pezzi	10 portaoggetti (pronti all'uso), 6 (12) pozzetti per portaoggetto, ogni pozzetto rivestito con <i>Crithidia lucilliae</i>
Controllo negativo CI CONTROL - 1 x 2,0 mL	Diluizione di siero umano (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio)
Controllo positivo CII CONTROL + 1 x 2,0 mL	Diluizione di siero umano (pronto all'uso; contiene azoturo di sodio)
Diluente per campioni C DIL 1 x 15 (2 x 12,5) mL	Soluzione (pronta all'uso; contiene ProClin 950)
Tampone PBS B WASHB 2 x 10 g	Tampone PBS (sostanza secca per 2 x 1000 mL)
Coniugato IgG D CONJ 2 x 2,0 (3,0) mL	Anticorpo policlonale anti-IgG umane coniugato con FITC (pronto all'uso; contiene DAPI e azoturo di sodio)
Membrana assorbente F TEMPL 10 pezzi	Membrane assorbenti
Soluzione di montaggio G MOUNT 1 x 3,0 mL	Soluzione tamponata in PBS con glicerolo e reagente anti-affievolimento (pronta all'uso; contiene azoturo di sodio)
Coprioggetto H COVER 12 pezzi	Coprioggetto
Certificato CQ 1 pezzo	-
Istruzioni per l'uso 1 pezzo	-

5 Materiale necessario ma non fornito

- Comuni apparecchiature di laboratorio
- Pipette di precisione (5 - 1000 µL) e puntali monouso
- Cilindri graduati (100 - 1000 mL)
- Provette per la preparazione di diluizioni e portaprovette

- Miscelatore a vortice o altri rotatori
- Camera umida
- Bottiglia di plastica a spruzzo per il lavaggio
- Vaschette Coplin o piatti di colorazione portavetrini
- Sistema AKLIDES® o akiron® o equivalenti
- Carta assorbente
- Acqua distillata o deionizzata

6 Conservazione e stabilità

Una volta ricevuti, tutti i componenti del saggio devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, preferibilmente nella confezione originale del kit. Se conservati correttamente nei loro contenitori originali, tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, tutti i componenti del kit sono stabili per almeno 2 mesi, se conservati correttamente.

7 Informazioni generali

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*. Le istruzioni per l'uso devono essere lette attentamente prima dell'uso. Esse sono valide solo per il presente prodotto con la composizione indicata e devono essere seguite rigorosamente per garantirne risultati affidabili. Eventuali deviazioni possono portare a risultati errati. I componenti non devono essere scambiati con reagenti di lotti diversi o di altri produttori.

La contaminazione dei reagenti deve essere evitata utilizzando tecniche asettiche durante il prelievo dai contenitori. Dopo l'uso, le fiale di reagente devono essere chiuse ermeticamente con i rispettivi tappi.

La contaminazione incrociata di campioni o reagenti può portare a risultati incoerenti e deve essere evitata utilizzando tecniche di pipettaggio coerenti.

L'esposizione dei reagenti alla luce intensa deve essere evitata per tutta la durata della procedura di analisi e della conservazione.

Un lavaggio insufficiente comporta una scarsa precisione e segnali di misura elevati. Dopo ogni fase di lavaggio, il liquido residuo deve essere completamente rimosso.

8 Preparazione

8.1 Preparazione dei reagenti

Tutti i componenti, compresi i portaoggetti, devono essere portati a temperatura ambiente (TA: da 18 °C a 25 °C) prima dell'uso per almeno 30 minuti. Tutti i componenti liquidi devono essere miscelati delicatamente per garantirne l'omogeneità.

8.1.1 Portaoggetto

I portaoggetti sono sigillati singolarmente con un essiccante in buste di alluminio. Rimuovere con cura i portaoggetti dalle buste direttamente prima dell'uso.

8.1.2 Controlli

I controlli positivi e negativi sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I controlli devono essere utilizzati in ogni analisi. I laboratori possono anche convalidare i propri campioni di controllo e utilizzarli in alternativa.

8.1.3 Diluente per campioni

Il diluente per campioni è pronto all'uso.

8.1.4 Tampone PBS

Una miscela di tampone PBS deve essere sciolta in 1,0 L di acqua distillata in agitazione o scuotendo prima dell'uso. La soluzione di lavaggio risultante deve avere un pH di $7,4 \pm 0,2$ ed è stabile per quattro settimane se conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Non utilizzare se il pH cambia, se la soluzione diventa torbida o se si formano precipitati.

8.1.5 Coniugato

Il coniugato è pronto all'uso. Evitare l'esposizione alla luce intensa.

8.1.6 Soluzione di montaggio

A soluzione di montaggio è pronto all'uso.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Tipologia di campione

Si raccomanda l'uso di siero appena raccolto da sangue prelevato mediante venipuntura. Si deve evitare l'uso di campioni itterici, lipemici, emolitici o contaminati da batteri. Le sostanze insolubili devono essere rimosse dal campione mediante centrifugazione. I campioni non devono essere inattivati termicamente.

8.2.2 Diluizione del campione

I campioni devono essere diluiti 1:10 (ad es. 10 µL + 90 µL) con il diluente per campioni e miscelati accuratamente. Si deve evitare la formazione di schiuma.

8.2.3 Conservazione dei campioni

I campioni possono essere conservati a 2 °C - 8 °C fino a tre giorni. La conservazione a lungo termine richiede -20 °C. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Per un uso multiplo, i campioni devono essere aliquotati e conservati a -20 °C.

9 Prestazioni del saggio

9.1 Procedura

È necessario preparare un numero sufficiente di portaoggetti. Non toccare i pozzetti e non lasciare asciugare il substrato nei pozzetti durante l'intera procedura del saggio. È necessario rispettare i tempi e le temperature di incubazione indicati ed evitare significativi sbalzi di tempo durante il pipettaggio dei campioni e dei reagenti.

Fase	Descrizione
1. Aggiunta di controlli e campioni diluiti	Aggiungere 20 µL di controlli pronti all'uso e 20 µL di campioni diluiti per pozzetto. Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente coperto
2. Incubazione	Incubare per 30 min a temperatura ambiente in una camera umida.
3. Ciclo di lavaggio	Aspirare il liquido da ciascun pozzetto o risciacquare delicatamente con la soluzione di lavaggio PBS utilizzando una bottiglia di plastica a spruzzo. Non concentrare il flusso di PBS direttamente sui pozzetti. Per evitare contaminazioni, evitare il risciacquo incrociato da un pozzetto all'altro. Per i portaoggetti a più file, far scorrere il flusso di PBS dalla linea mediana del portaoggetto in successione lungo entrambe le file fino al bordo. Lavare 2 x 5 min cambiando soluzione di PBS nelle vaschette e agitando delicatamente dopo l'introduzione e prima della rimozione. Rimuovere i portaoggetti dalle vaschette e asciugare con cura il portaoggetto battendone il bordo su carta assorbente ed asciugare con cura il portaoggetto intorno ai pozzetti usando una membrana assorbente per rimuovere le gocce residue.
4. Aggiunta del coniugato	Aggiungere 20 µL di coniugato pronto all'uso in ciascun pozzetto. Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente coperto.

5. Incubazione	Incubare per 30 min a TA in camera umida al riparo dalla luce diretta.
6. Ciclo di lavaggio	Ripetere l'intero ciclo di lavaggio del passo 3.
7. Aggiunta di soluzione di montaggio	Applicare 1 goccia per pozzetto di soluzione di montaggio pronto all'uso.
8. Copertura	Posizionare con cura un coprioggetto sul portaoggetto, lasciando che il soluzione di montaggio formi uno strato uniforme tra il portaoggetto e il coprioggetto. Evitare la formazione di bolle d'aria. Eliminare l'eccesso di soluzione di montaggio dai bordi e dal fondo del portaoggetto con carta assorbente.
9. Analisi	Analizzare il portaoggetto utilizzando il sistema AKLIDES® o akiron® con lunghezze d'onda di eccitazione di 490 nm e di emissione di 520 nm entro 24 ore.

9.2 Automazione

Il processamento automatizzato dell'immunodosaggio deve essere eseguita in modo analogo all'uso manuale e convalidata dall'utente.

10 Valutazione del saggio

10.1 Tracciabilità metrologica

L'immunodosaggio viene calibrato utilizzando campioni interni come riferimenti.

10.2 Valutazione

Il sistema AKLIDES® o akiron® Il sistema AKLIDES® o akiron® fornisce all'operatore immagini e un suggerimento per la valutazione qualitativa. I campioni valutati possono essere verificati al PC utilizzando le immagini memorizzate.

Un campione è considerato negativo per gli anticorpi anti-nDNA se l'intensità di fluorescenza misurata è inferiore a un valore di soglia definito dal software AKLIDES® o akiron®.

Un campione è considerato positivo per gli anticorpi anti-nDNA se l'intensità di fluorescenza del cinetoplasto o del cinetoplasto e del nucleo all'interno della cellula *Crithidia* è misurata al di sopra del valore di soglia definito dal software AKLIDES® o akiron®.

10.3 Criteri di validità

I saggi sono validi solo se sono soddisfatti i seguenti criteri di validità:

- Il controllo negativo deve essere valutato negativo.
- Il controllo positivo deve essere valutato positivo.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

10.4 Risoluzione dei problemi

In caso di saggi non validi, occorre verificare le date di scadenza e le condizioni di conservazione, i tempi e le temperature di incubazione e l'esatta calibrazione di tutti gli strumenti utilizzati. Se non è stato possibile identificare un motivo per cui il saggio non è valido, contattare il fornitore o il produttore del prodotto. Una guida alla risoluzione dei problemi è disponibile su richiesta.

10.5 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento sono indicati di seguito:

	Interpretazione
Titolo anticorpale < 1:10	negativo
Titolo dell'anticorpo ≥ 1:10	positivo

A causa delle diverse sieroprevalenze nelle singole regioni, ogni laboratorio deve verificare gli intervalli di riferimento con analisi proprie e adattarli, se necessario.

10.6 Interpretazione dei risultati dei saggi

Un risultato positivo del saggio indica la presenza di anticorpi specifici. Un risultato negativo indica l'assenza di anticorpi specifici, ma non esclude la possibilità di una reazione autoimmune. Nel caso di un saggio incerto, non è possibile una valutazione affidabile.

Da un lato, gli anticorpi contro il DNA nativo (nDNA) sono altamente specifici per il lupus eritematoso sistemico (LES). Sebbene bassi livelli di anticorpi anti-nDNA possano essere osservati in altre malattie reumatiche, come la sindrome di Sjögren, la malattia mista del tessuto connettivo (MMTC) e la dermatomiosite, alti titoli di anticorpi anti-nDNA vengono rilevati quasi esclusivamente nel LES. Per questo modello, la determinazione specifica degli anticorpi contro il DNA nativo dovrebbe essere uno strumento necessario nella diagnosi del LES.

D'altra parte, la sensibilità della rilevazione tradizionale degli anticorpi anti-nDNA sui *Crithidia* è inferiore rispetto ad altri metodi diagnostici. L'uso di uno speciale diluente per campioni aumenta la sensibilità del saggio. Tuttavia, in caso di sospetto di LES e di risultato negativo del saggio di immunofluorescenza, è necessario eseguire anche un saggio basato su altre metodologie.

Gli anticorpi contro altre parti della cellula di *Crithidia* potrebbero determinare un rispettivo modello fluoroscopico (ad esempio, i nuclei cellulari). Questi motivi devono essere giudicati negativi in relazione agli anticorpi anti-nDNA, ma possono indicare altre malattie autoimmuni.

10.7 Limiti del metodo

Campioni e soluzioni di lavaggio contaminati da batteri o funghi potrebbero causare una colorazione aspecifica del substrato di coltura cellulare.

Gli enzimi proteolitici presenti nei campioni dei pazienti potrebbero danneggiare i substrati cellulari fissati sul portaoggetto.

Campioni e soluzioni di lavaggio contaminati da batteri o funghi potrebbero causare una colorazione aspecifica del substrato di coltura cellulare.

Gli enzimi proteolitici presenti nei campioni dei pazienti potrebbero danneggiare o perdere le sezioni di tessuto fissate sul portaoggetto.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Caratteristiche delle prestazioni analitiche

11.1.1 Sensibilità e specificità analitica

Non è stata osservata alcuna reattività crociata di anticorpi contro antigeni simili.

11.1.2 Precisione

La precisione dei risultati del saggio è stata valutata mediante la determinazione della variazione intra- e inter-saggio attraverso l'analisi di più campioni con diverse attività anticorpali. Non sono state rilevate differenze nella valutazione qualitativa.

11.2 Caratteristiche delle prestazioni diagnostiche

11.2.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state valutate mediante l'analisi di 18 campioni di pazienti affetti da LES e 45 campioni di pazienti non affetti da LES.

	Prestazioni diagnostiche
Sensibilità	94,4 %
Specificità	98,9 %

12 Avvertenze e precauzioni

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* da parte di personale qualificato, autorizzato e addestrato. Tutti i componenti del saggio e i campioni umani devono essere

maneggiati con cura in quanto potenzialmente pericolosi. È necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio (BPL) e a tutte le normative pertinenti.

Nel caso in cui il prodotto sia danneggiato o le informazioni sul prodotto, compresa l'etichettatura, siano errate o non corrette, si prega di contattare il produttore o il fornitore.

Questo prodotto contiene preparati di origine umana e/o animale. Qualsiasi materiale derivato da fluidi corporei umani o da organi utilizzati per la preparazione dei componenti è stato testato ed è risultato negativo all'HBsAg (Antigene di superficie del virus dell'epatite B) e agli anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Tuttavia, tutti i componenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente pericolosi in conformità alle leggi nazionali e alle linee guida appropriate sulla sicurezza biologica.

Poiché il prodotto contiene materiali potenzialmente pericolosi, è necessario seguire le seguenti precauzioni: Non fumare, mangiare o bere durante la manipolazione del materiale del kit o dei campioni. Evitare il contatto diretto con il materiale del kit o con i campioni indossando guanti protettivi, camice da laboratorio e occhiali di sicurezza. Non pipettare mai il materiale per bocca. Pulire prontamente le fuoriuscite e lavare accuratamente la superficie interessata con un decontaminante. Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.

Alcuni reagenti contengono ProClin (< 1,0%) come conservante, possono causare sensibilizzazione cutanea (H317) e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose (P280, P333+P313).

Alcuni reagenti contengono azoturo di sodio ($\leq 0,1\%$) come conservante e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose. La possibile formazione di azoturi di metalli pesanti negli scarichi deve essere evitata mediante un sufficiente risciacquo con acqua.

Alcuni reagenti contengono DAPI (5 µg/mL) come agente colorante e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose.

È necessario osservare le informazioni contenute nella scheda di sicurezza relative ai possibili pericoli, alle misure di primo soccorso, alle misure da adottare in caso di rilascio involontario di grandi quantità, alla manipolazione e allo stoccaggio, ai dispositivi di protezione individuale, alle informazioni sullo smaltimento e alle informazioni sulla tossicologia.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità statale competente in cui è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente.

13 Smaltimento

Per la decontaminazione e lo smaltimento è necessario attenersi alle raccomandazioni del CDC e alle linee guida e normative ambientali locali e nazionali pertinenti. I campioni, i materiali potenzialmente contaminati e i rifiuti infettivi devono essere decontaminati, ad esempio mediante autoclavaggio per 20 minuti a 121 °C.

14 Riferimenti

- Tan EM: Antibodies to nuclear antigens (ANA) and their immunobiology and medicine. Adv. Immunol. 1982, 33, 167 - 240.

- Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982, 25, 1271 – 7.

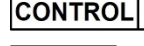
- Smeenk RJT: DNA as Antigen in SLE. Manual of Biological Markers of Disease. Kluwer Academic Publishers, B 2.1: 1-15, Dordrecht 1994-

- Humbel RL: Autoanticorps et Maladies Auto-Immunes, Elsevier 2e edition, 1997.

- Lyerla HC, Forrester FT: The Immunofluorescence (IF) test. In: Immunofluorescence methods in virology, USDHHS, Georgia, 1979, 71 – 81.

- Conrad K, Ittenson A, Reinhold D, Fischer R, Roggenbuck D, Büttner T, Bosselmann HP, Steinbach J, Schössler W. High sensitive detection of double-stranded DNA autoantibodies by a modified Crithidia luciliae immunofluorescence test. Ann N Y Acad Sci. 2009 Sep;1173:180-5.

15 Simboli

	Produttore
	Marchio di conformità CE
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Numero di catalogo
	Identificatore univoco del dispositivo
	Codice lotto
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene un numero sufficiente di <n> saggi
	Non riutilizzare
	Attenzione
	Avvertenze
	Rischio biologico
	Tenere lontano dalla luce del sole
	Portaoggetto con x pozzetti
	Controllo negativo
	Controllo positivo
	Diluente per campioni
	Coniugato
	Tampone di lavaggio
	Soluzione di montaggio
	Membrana assorbente
	Coprioggetto

16 Modifiche

Modifiche alle attuali istruzioni per l'uso	
Versione attuale	013/10.2025
Sintesi delle modifiche	Modifiche redazionali nel capitolo 8.1.5