

# CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA SOUPRAVY/ SUBSTRÁTOVÁ SKLA

Czech

## Pro diagnostické použití *in-vitro*

Kód produktu: FK002.\_  
FS002.\_

Vyrobena ve společnosti:

The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK  
www.bindingsite.co.uk

Telefon: +44 (0) 121 436 1000

Fax: +44 (0) 121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk



### 1 POUŽITÍ

Tento výrobek (souprava nebo substrátová skla) je určen pro screening a titraci cirkulujících protilátek proti dvouřetězcové DNA (dsDNA). Tato autoprotilátka je vodičkem pro diagnózu a sledování léčby SLE (SLE = systémový lupus erythematoses). Vhodnost použití samotné prodávány substrátových skel s jinými detekčními systémy nebyla stanovena, avšak použití těchto skel v takových testech není vyloučeno.

### 2 SOUHRN A VÝKLAD

Deoxyribonukleová kyselina se přirozeně vyskytuje nejméně ve třech různých formách: v pravotočivé dvouřetězcové konformaci (dsDNA), v levotočivé dvouřetězcové konformaci (Z-DNA) a jednořetězcové konformaci (ssDNA). Všechny formy obsahují determinanty, proti kterým mohou být tvořeny autoprotilátky. Autoprotilátky proti dsDNA a ssDNA jsou běžně nalézány u pacientů s autoimunitními chorobami.

Protilátky proti ssDNA (proti nukleotidovým bázím molekuly DNA) nejsou specifické pro určité onemocnění, nacházejí se u pacientů s revmatoidní artritidou, SLE, systémovou sklerózou a ostatními neimunologickými poruchami. Jsou hlavní složkou většiny anti-nukleárních protilátek (ANA's), které poskytují při použití metody nepřímé imunofluorescence homogenní vzor.

Protilátky proti dsDNA jsou proti fosfát-deoxyribózové ose molekuly DNA. Jsou méně obvyklé než protilátky proti ssDNA, ale jsou klinicky významnější ze dvou hlavních důvodů. Za prvé: vysoké titry protilátek proti dsDNA jsou prakticky vždy nalézány pouze u pacientů se SLE a za druhé: titry protilátek dobře korelují s aktivitou choroby. To představuje důležitý znak vývoje i závažnosti onemocnění i stupně odpovědi na jakoukoliv následnou léčbu.

Ke stanovování protilátek proti dsDNA bylo během let užíváno několik metod jako např. pasivní aglutinace, fixace komplementu a RIA. Krevní bičkovec *C. luciliae*, používaný jako substrát pro metodu nepřímé imunofluorescence, je citlivým a specifickým materiálem pro screeningový test. V těle bičkovce se nachází organela zvaná kinetoplast, což je obří mitochondrie obsahující dsDNA (Lit. 1), ale zjevně neobsahující histony a ostatní savčí nukleární antigeny. Výhodou screeningových testů na přítomnost protilátek proti dsDNA využívajících *C. luciliae* je jejich specifita daná stavbou kinetoplastu (Lit. 2 a 3).

### 3 PRINCIP

Při tomto stanovení se používá technika nepřímé imunofluorescence (Lit. 4), při níž se pacientské vzorky a příslušné kontrolní vzorky inkubují na substrátu *C. luciliae*. Nenařazené protilátky se odmyjí a poté se přidá konjugát příslušné sekundární protilátky s fluoresceinem. Nenařazený konjugát se odmyje jako v předcházejícím kroku. Zpracovaná substrátová skla se vyhodnocují pod fluorescenčním mikroskopem, kde pozitivní vzorky na dsDNA vykazují jaskravě zelenou fluorescenci kinetoplastu.

### 4 REAGENCE

4.1 Substrát *C. luciliae* na sklech (o 5 nebo 10 jamkách).

#### Pouze soupravy:

4.2 Pozitivní kontrolní sérum poskytující imunofluorescentní zbarvení kinetoplastu, obsahující 0,099% azidu sodného. Naředěno, určeno pro přímé použití.

4.3 Negativní kontrolní sérum obsahující 0,099% azidu sodného. Naředěno, určeno pro přímé použití.

4.4 Afinitně purifikovaná ovčí protilátka proti lidskému IgG (řetězec gama) konjugovaná s isothiokyanátem fluoresceinu, obsahující 0,099% azidu sodného. Naředěno, určeno pro přímé použití.

4.5 1% roztok Evansovy modři, pro vybarvení pozadí, jehož použití je věcí volby.

4.6 Izotonický fosfátový tlumivý roztok (PBS), dodávaný ve formě dvacetinásobné koncentrovaného roztoku.

4.7 Savé papíry určené k vysoušení povrchu skel mezi jamkami.

4.8 Montovací médium, obsahující činidlo, které zabraňuje spontánnímu vyhasínání fluorochromu (DABCO, 1,4 diazabicyclo [2.2.2] oktan).

4.9 Krycí sklíčka.

### 5 UPOZORNĚNÍ

Všichni dárči séra dodávaného v této soupravě byli s negativním výsledkem testování na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B a protilátek proti viru hepatitidy C a HIV 1 & 2. Uvedené testy však nemohou zaručit nepřítomnost infekčního agens. Je nutné zavést správné metody používání a likvidace materiálu, odpovídající jeho potenciální infekčnosti. Tyto postupy mohou provádět pouze pracovníci, kteří byli v těchto metodách odpovídajícím způsobem proškoleni.

Tento výrobek by měly používat pouze vhodné školené osoby a měly by striktně dodržovat daný postup.

Některé složky souprav obsahují 0,099% azid sodný jako konzervační látku a je proto nutné s ním zacházet s náležitou opatrností - nesmí dojít k požití nebo ke kontaktu s pokožkou nebo sliznicemi. Pokud dojde k potřísnění, opláchněte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Azid sodný může reagovat s olovem nebo mědí v potrubí za vzniku výbušných azidů. Proto likvidované reagentie splachujte velkým množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidu v potrubí.

### 6 SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Neotevřené soupravy nebo skla je nutné skladovat při 2-8°C a lze je používat až do data expirace uvedeného na štítku krabice. NEZAMRAZUJTE. Pokud jsou skla z alobalového sáčku vyjmuta, měla by být použita okamžitě. Naředěný tlumivý roztok PBS lze skladovat při 2-8°C až po dobu jednoho měsíce. Konjugát FITC je nutné vždy chránit před slunečním světlem a fluorescenčním nebo UV zářením. Všechna činidla je nutné skladovat při 2-8°C.

### 7 ODBĚR VZORKŮ

Používejte vzorky sér. Ponechte krev přirozeně koagulovat a oddělte sérum co možná nejdříve, aby nedošlo k hemolýze. Sérum lze skladovat při teplotě 2-8°C po dobu až 7 dnů před provedením testu (Lit. 7), pro delší skladování rozplněné v malých objemech při teplotě -20°C nebo nižší. Séra nezamrazujte a nerozmrazujte více než jednou. Nepoužívejte lipemická, hemolytická nebo mikrobiálně kontaminovaná séra, protože by se mohly vyskytnout snížené titry nebo nejasně vybarvené struktury.

### 8 METODIKA

#### 8.1 Materiály dodávané v soupravách

##### Souprava FK002.1 na 50 testů

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (5 jamková substrátová skla s *Crithidia luciliae*)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (naředěného pozitivního kontrolního séra)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (naředěného negativního kontrolního séra)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (konjugátu protilátky proti lidskému IgG (gama) s FITC)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (roztoku 1% Evansovy modři)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (koncentrovaného PBS, 20x)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (montovacího média)
- 20 *Blotters* (ks savých papírů)
- 10 *Coverslips* (ks krycích sklíček, 22 x 70mm)
- 1 x návod k použití

##### Souprava FK002.2 na 250 testů

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (10 jamková substrátová skla s *Crithidia luciliae*)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (naředěného pozitivního kontrolního séra)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (naředěného negativního kontrolního séra)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (konjugátu protilátky proti lidskému IgG (gama) s FITC)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (roztoku 1% Evansovy modři)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (koncentrovaného PBS, 20x)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (montovacího média)
- 50 *Blotters* (ks savých papírů)
- 25 *Coverslips* (ks krycích sklíček, 22 x 70mm)
- 1 x návod k použití

##### FS002.1, FS002.2, FS002.3

- 10 x 5 jamková skla, 25 x 10 jamková skla, 100 x 10 jamková skla
- 1 x návod k použití

#### 8.2 Další potřebný materiál

- 8.2.1 Destilovaná voda pro ředění koncentrovaného PBS.
- 8.2.2 Láhev pro tlumivý roztok PBS a plastická stříčka pro počáteční opláchnutí skel PBS.
- 8.2.3 Mikropipety a špičky pro jedno použití pro nanesení pacientských vzorků.
- 8.2.4 Vlhká komůrka pro inkubační kroky (např. komora s přichytnými magnetickými pásky, kódové označení BD010).
- 8.2.5 Fluorescenční mikroskop vybavený excitačním filtrem (495nm) a bariérovým filtrem (515nm).
- 8.2.6 Pokud používáte pouze substrátová skla, můžete od firmy The Binding Site získat následující materiály: pozitivní kontrolu (FA109), negativní kontrolu (CON 92), konjugát protilátky proti lidskému IgG (gama) s FITC (buď FA004 – naředěno, pro přímé použití nebo AF004 s pracovním ředěním 1/100 – 1/400), PBS (CON 3.3), Evansova modř (CON 93, použití podle vlastní volby), montovací médium (CON 195.1/2), savé papíry, krycí sklíčka.

#### 8.3 Pracovní postup testu

##### Kontrola jakosti

Pozitivní a negativní kontroly by měly být použity vždy při testování každé série vzorků. Je doporučeno, aby titrování pozitivní kontrolní vzorek byl součástí každého stanovení.

- 8.3.1 Montovací médium: Vyjměte montovací médium z chladničky a nechte jej před použitím vyteperovat na pokojovou teplotu (18-28°C).
- 8.3.2 Ředění koncentrovaného PBS: Koncentrovaný PBS ředte destilovanou vodou (1 díl koncentrovaného PBS + 19 dílů destilované vody) a promíchejte. PBS se používá k ředění pacientských vzorků a jako promývací tlumivý roztok. Poznámka: Celé množství PBS ze soupravy naředte nejednou pouze v případě, že celou soupravu zpracujete do jednoho měsíce.

### 8.3.3 Ředění patientských vzorků

**Screening:** Patientské vzorky ředte 1/10 přidáním 50 $\mu$ L séra k 450 $\mu$ L tlumivého roztoku PBS.

**Titrace:** Vzorky naředte tlumivým roztokem PBS geometrickou řadou (např. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, atd.).

Např.: Vezměte 100 $\mu$ L vzorku naředěného 1/10 a smíchejte se 100 $\mu$ L PBS, výsledné ředění je 1/20. Opakujte pro další naředění.

8.3.4 **Substrátová skla.** Před vyjmutím z alobalového sáčku ponechte skla volně v laboratoři pro dosažení pokojové teploty (18-28°C). Skla označte vhodným způsobem, umístěte je do vlhké komůrky a nakapejte po jedné kapce pozitivní a negativní kontroly do jamek označených 1 a 2. Do zbývajících jamek nakapejte po 25 $\mu$ L naředěných patientských vzorků.

8.3.5 **Inkubace substrátových skel.** Skla inkubujte po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě (18-28°C).

8.3.6 **Promývání v PBS.** Vyjměte skla z vlhké komůrky a krátce stříčkou s PBS opláchněte. Nestříkejte přímo do jamek. Skla umístěte do držáku, ponořte do tlumivého roztoku PBS a protřepávejte nebo míchejte po dobu 10 minut.

8.3.7 **Přidání konjugátu s fluoresceinem.** Odlepněte přebytek PBS a osušte plochu skel kolem jamek savým papírem, dodávaným se soupravou. Skla umístěte zpět do vlhké komůrky a okamžitě převrstvěte každou jamku fluorescentním konjugátem. JAMKY NENECHÁVĚJTE NEZAKRYTÉ DÉLE NEŽ 15 VTEŘIN. Zaschnutí substrátu ovlivňuje závažným způsobem výsledek.

8.3.8 **Inkubace skel.** Skla inkubujte po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě (18-28°C) v temnu.

8.3.9 **Promývání v PBS.** Opakujte krok 6. Vybarvení pozadí na základě vlastní volby: Přidejte 2-3 kapky 1 % Evansovy modři na 100mL PBS před ponořením do tlumivého roztoku.

8.3.10 **Zaliti preparátu a překrytí krycím sklíčkem.** Vyjměte jedno sklo z promývací lázně. Pomocí savých papírů k sušení substrátových skel rychle osušte okolí jamek a do každé jamky přidejte kapku montovacího média. Velmi opatrně zakryjte krycím sklíčkem tak, aby jste předešli tvorbě vzduchových bublin. Pokud se vzduchové bubliny objeví, nesnažte se je odstranit. Opatrně oťřete veškeré nadbytečné montovací médium.

8.3.11 **Prohlížení skel pod fluorescenčním mikroskopem.** Hotová skla by měla být prohlížena co nejdříve, ale mohou být skladována po dobu až jednoho týdne při teplotě 2-8°C v temnu bez významné ztráty fluorescence.

10.6 Tento test je pouhým diagnostickým prostředkem. Pozitivní výsledky testu naznačují přítomnost určitého onemocnění; tyto výsledky však musí být potvrzeny klinickými nálezy a dalšími sérologickými testy. Výsledky získané tímto testem nejsou samy o sobě průkazem přítomnosti nebo nepřítomnosti choroby.

Informace FDA (USA) - viz titulní strana anglického návodu.

## 11 OČEKÁVANÉ HODNOTY

Substrátová skla s *C. luciliae* byla použita pro testování pacientů s řadou různých chorob pojivových tkání a také 50 náhodně vybraných normálních dárců krve. Výsledky jsou uvedeny v tabulce:

Skupina pacientů	Počet	Pozitivní imunofluorescentní zbarvení <i>C. luciliae</i>
SLE	100	32
Revmatoidní artritida	10	0
Sklerodermie	10	0
Sjögrenův syndrom	5	0
Normální	50	0

## 12 CHARAKTERISTIKA STANOVENÍ

### 12.1 Přesnost

Pět skel téže šarže bylo testováno se známým kontrolním vzorkem naředěným do koncového bodu. Na všech pěti sklech bylo stanoveno ředění koncového bodu 1/5120, což prokazuje, že mezi skly téže šarže není významný rozdíl. Tři skla z rozdílných šarží byla testována se známým kontrolním vzorkem naředěným v poměru 1/25. Všechna tři skla poskytla stejnou intenzitu imuno fluorescenčního zbarvení (2+).

### 12.2 Citlivost

Citlivost testů a mez detekce závisí na použitém mikroskopu. Příslušný mezinárodní kalibrátor pro standardizaci citlivosti neexistuje.

### 12.3 Specifita

Soupravou *C. luciliae* firmy The Binding Site a srovnatelnou komerčně dostupnou IFA soupravou bylo testováno 46 známých sér s vysokými hladinami protilátek proti dsDNA a 50 normálních sér. Intenzita imunofluorescentního zbarvení byla klasifikována jako pozitivní (+), silně pozitivní (2+) a negativní (-):

Kvadrant	Souprava The Binding Site			
	2+	+	-	-
Kvadrant	2+	23	8	0
	+	1	14	0
	-	0	0	50

## 13 LITERATURA

- Arden, L.A., de Groot, E.R., Felkamp, T.E.W. (1975): Immunology of DNA III. *Critithidia luciliae*, a sample substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad.Sci. 254: 505-515.
- Somerfield, S.D., Roberts, M.W., Booth, R.J. (1981): Double stranded DNA antibodies: comparison of four methods of detection. J.Clin.Path. 34: 1032-1035.
- Sontheimer, R.D., Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Critithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab.Clin.Med. 91: 550-558.
- Weller, T.H., Coons, A.H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro. Prov. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789-794.
- Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J.Rheum. 2: 215-220.
- Balou, S.P., Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Critithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
- Protein Reference Unit Handbook of Autoimmunity (3<sup>rd</sup> Edition) 2004. Ed A Milford Ward. J Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

## 14 SOUHRN PŘEDVEDENÍ TESTU

- 14.1 Nechejte vytemperovat montovací médium na pokojovou teplotu.
- 14.2 Naředte PBS destilovanou vodou.
- 14.3 Patientská séra naředte 1/10 pomocí PBS.
- 14.4 Skla vyjměte z ledničky a nechejte je vytemperovat na pokojovou teplotu (18-28°C).
- 14.5 Sklo vyjměte z alobalového sáčku a umístěte je do vlhké komůrky. Do jamek přidejte po 25 $\mu$ L kontrolních vzorků a naředěných patientských sér.
- 14.6 Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (18-28°C).
- 14.7 Skla opláchněte proudem PBS. Promyvejte skla v držáku po dobu 10 minut.
- 14.8 Okolí všech jamek osušte, sklo umístěte zpět do vlhké komory a okamžitě do jamek přidejte po kapce fluorescenčního konjugátu.
- 14.9 Skla inkubujte 30 minut.
- 14.10 Opět odmyjte - jak je popsáno v bodě 7.
- 14.11 Okolí jamek osušte, do každé jamky přidejte montovací médium a přiložte krycí sklíčko.
- 14.12 Skla prohlížejte pod fluorescenčním mikroskopem.

## 9 VÝSLEDKY

### 9.1 Kontrola jakosti

Pozitivní kontrolní vzorek by měl poskytovat specifický jablečkový zelený imunofluorescentní obraz kinetoplastu. Buněčné jádro může i nemusí být zbarveno. Negativní kontrolní vzorek by měl vykazovat matně nevyrazně zelené zbarvení organismu, bez zřejmé fluorescence. Pokud kontrolní vzorky neposkytují popsané obrazy, měl by být test opakován.

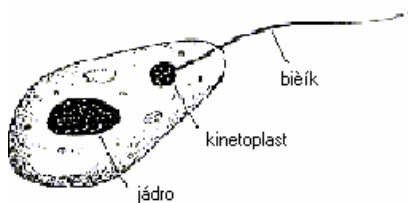
### 9.2 Interpretace výsledků

#### 9.2.1 Negativní

Vzorek je považován za negativní, jestliže specifické fluorescenční zbarvení kinetoplastu je shodné nebo slabší než v jamce s negativní kontrolou, i když ostatní struktury jako bazální tělísko, bičík nebo jádro jsou zbarveny.

#### 9.2.2 Pozitivní

Vzorek je považován za pozitivní, jestliže specifické fluorescenční zbarvení kinetoplastu je intenzivnější než zbarvení negativní kontroly. Pro zřetelné odlišení kinetoplastu od jádra porovnejte vyhodnocovaný obraz s obrazem v jamce s pozitivní kontrolou. Kinetoplast bude vždy umístěn blíž bičíku (viz obrázek).



Poznámka: Každá laboratoř by si měla stanovit hranici, nad níž je pozitivní výsledek považován za klinicky významný.

K INTERPRETACI VÝSLEDKŮ POUŽÍVEJTE POUZE JEDNOTLIVÉ DOBRĚ DEFINOVANÉ ORGANISMY

## 10 OMEZENÍ POSTUPU

- 10.1 Citlivost stanovení bude ovlivněna zdrojem světla, filtry a optikou u různých typů fluorescenčních mikroskopů. Na výkonost mikroskopu má významný vliv správná údržba, především vycentrování rtuťové výbojky a její včasná výměna po uplynutí doporučené doby provozu.
- 10.2 U pacientů s polékovým SLE se mohou vyskytovat protilátky proti dsDNA (Lit. 5).
- 10.3 Vzorky pacientů léčených steroidy mohou proti dsDNA dávat negativní výsledky (Lit. 6).
- 10.4 Falešně pozitivní nebo negativní výsledky se mohou objevit u mikrobiálně kontaminovaného séra.
- 10.5 Při nadměrném zbarvení pozadí nebo jakýchkoliv obtížích při interpretaci výsledku může uživatel použít jako kontrolu PBS.