

1	Intended use
2	Summary and explanation
3	Principle
4	Reagents
5	Caution
6	Storage and stability
7	Specimen collection
8	Methodology
9	Results
10	Limitations of procedure
11	Expected values
12	Performance characteristics
13	References
14	Summary of procedure

Deutsch
Français
Español
Português
Italiano

Siehe Seite
Cf. page
Página
Veja páginas
Pagine

CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA KITS/SUBSTRATE SLIDES

For in-vitro diagnostic use

**Product Code: FK002._
 FS002._**

*Product manufactured by:
The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, U.K.
www.bindingsite.co.uk*

*Telephone: +44 (0) 121 436 1000
Fax: +44 (0) 121 430 7061
e-mail: info@bindingsite.co.uk*

FDA (USA) Information
Analyte Name: Anti DNA Antibodies
Complexity Cat: High



1 INTENDED USE

This product (kit or substrate slides) is intended for use in the screening and titration of circulating anti double stranded DNA (dsDNA) autoantibodies. This autoantibody is a marker for the diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus (SLE). For slides sold separately, the suitability for use with other detection systems has not been assessed but use in such assays should not necessarily be excluded.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

Deoxyribonucleic acid is found naturally in at least three different forms: a right handed double stranded conformation (dsDNA); a left-handed double stranded conformation (Z-DNA) and a single stranded conformation (ssDNA). All forms contain determinants against which autoantibodies can be produced. dsDNA and ssDNA autoantibodies are routinely encountered in patients with autoimmune disease.

Antibodies to ssDNA (to the nucleotide bases of the DNA molecule) are not specific to a particular disease, being found in patients with rheumatoid arthritis, SLE, systemic sclerosis and other non-immunological disorders. They are a major constituent of most anti nuclear antibodies (ANAs), seen as a homogeneous pattern in indirect immunofluorescence assays.

Antibodies to dsDNA are against the phosphate deoxyribose backbone of the DNA molecule. They are less common than antibodies to ssDNA but are more clinically significant for two main reasons. Firstly, high titres of anti dsDNA are virtually only ever found in SLE patients and secondly, antibody titres correlate well with disease activity. This provides an important marker for both progression and severity of the disease and the degree of response to any subsequent treatment.

Several methods have been used over the years to detect antibodies to dsDNA, such as passive agglutination, complement fixation and RIA. The haemoflagellate, *C. luciliae* used as a substrate in indirect immunofluorescence assays, is a sensitive and specific screening test. *C. luciliae* possess an organelle called a kinetoplast; a giant mitochondrion containing dsDNA (ref. 1) but are apparently free of histones and other mammalian nuclear antigens. The advantage of *C. luciliae* based screening for dsDNA antibodies is its specificity, due to the composition of the kinetoplast (refs 2 and 3).

3 PRINCIPLE

This product utilises an indirect immunofluorescence technique (ref. 4). Patient samples and appropriate controls are incubated with the *C. luciliae* substrate. The unreacted antibodies are washed off and then an appropriate fluorescein labelled conjugate is applied. Unbound conjugate is washed off as before. Slides are viewed with a fluorescence microscope and dsDNA positive samples produce apple-green fluorescence of the kinetoplast.

4 REAGENTS

4.1 *C. luciliae* substrate slides (5- or 10-well).

Kits only

4.2 Positive control serum giving kinetoplast staining, containing 0.099% azide. Prediluted, ready for use.

4.3 Negative control serum, containing 0.099% sodium azide. Prediluted, ready for use.

4.4 Affinity purified sheep anti-human IgG (γ chain) fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) containing 0.099% sodium azide. Prediluted, ready for use.

- 4.5 1% Evans Blue, as an optional counterstain.
- 4.6 Phosphate buffered saline (PBS), a 20-fold concentrate in liquid form.
- 4.7 Blotters to blot around the wells after washing.
- 4.8 Mounting medium, containing an anti-fading agent (DABCO, 1, 4, diazabicyclo [2.2.2] octane).
- 4.9 Coverslips.

5 CAUTION

All donors of human serum supplied in this kit have been serum tested and found to be negative for Hepatitis B surface antigen and antibodies to Hepatitis C virus and Human Immunodeficiency Virus (HIV 1 & 2). However these tests cannot guarantee the absence of infective agents. Proper handling and disposal methods should be established as for all potentially infective material and only personnel adequately trained in such methods should be permitted to perform the procedures.

This product should only be used by suitably trained persons for the purposes stated. Adherence to the given procedure is recommended.

The kit components contain 0.099% sodium azide as a preservative and must be handled with caution – do not ingest or allow contact with skin or mucous membranes. If contact does occur wash with large volume of water and seek medical advice. Explosive metal azides may be formed with lead and copper plumbing; on disposal of reagent, flush with a large volume of water to prevent azide build up.

6 STORAGE AND STABILITY

Unopened kits/slides should be stored at 2-8°C and can be used until the expiry date given on the box label. DO NOT FREEZE. Once slides are removed from a foil bag, they should be used immediately. Diluted PBS buffer can be stored for up to one month at 2-8°C. The kit FITC conjugate should be kept out of sunlight, fluorescent or U.V. light whenever possible. All reagents should be stored at 2-8°C.

7 SPECIMEN COLLECTION

Use serum samples. Allow the blood to clot and separate the serum as soon as possible to prevent haemolysis. Sera may be stored at 2-8°C for up to 7 days prior to assay, or for prolonged storage, aliquoted and stored at -20°C or below (ref. 7). Do not freeze and thaw sera more than once. Avoid using lipaemic, haemolysed or microbially contaminated sera, as decreased titres or unclear staining patterns may occur.

8 METHODOLOGY

8.1 Materials provided

50T kit FK002.1

- 10 x *Crithidia* slide – 5-well
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (prediluted)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (prediluted)
- 1 x 4.5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC*
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain*
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)*
- 1 x 3mL *Mounting Medium*
- 20 x *Blotters*
- 10 x *Coverslips* (22 x 70mm)
- 1 x instruction leaflet

250T Kit FK002.2

- 25 x *Crithidia* slide – 10-well
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (prediluted)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (prediluted)
- 1 x 12.5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC*
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain*
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)*
- 1 x 10mL *Mounting Medium*
- 50 x *Blotters*
- 25 x *Coverslips* (22 x 70mm)
- 1 x instruction leaflet

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- 10 x 5-well slides, 25 x 10-well slides, 100 x 10-well slides
- 1 x instruction leaflet

8.2 Additional materials required

- 8.2.1 Distilled water to dilute PBS concentrate.
- 8.2.2 Container for PBS buffer and plastic squeeze bottle for initial wash in PBS.
- 8.2.3 Micropipettes and disposable tips to apply patient samples.

- 8.2.4 Humid chamber for incubation steps (e.g. Magnetic Staining Chamber, Code BD010).
- 8.2.5 Fluorescence microscope with 495nm exciter filter and 515nm barrier filter.
- 8.2.6 If using substrate slides only, the following materials will also be required (Binding Site codes given where applicable): positive control (FA109), negative control (CON 92), anti Human IgG (γ) Aff FITC (FA004, prediluted ready for use, or AF004, dilute 1/100-1/400 for use), PBS (CON 3.3), Evans Blue (CON 93, optional), mounting medium (CON 195.1/2), blotters, coverslips.

8.3 Test procedure

Quality control

Positive and negative controls should be used every time a batch of samples is tested. It is recommended that a control is titred with every assay.

- 8.3.1 Mounting medium: Remove the mounting medium from the fridge to allow it to reach room temperature (18-28°C) before it is needed.
- 8.3.2 Dilute PBS concentrate. Dilute PBS concentrate with distilled water (1 part PBS concentrate + 19 parts distilled water) and mix. The PBS is used for diluting patient samples and as a wash buffer. N.B. Only make up total amount of kit PBS if entire kit is to be used within one month.
- 8.3.3 Dilute patient samples.
Screening: Dilute patient samples 1/10 by adding 50μL of serum to 450μL of PBS buffer.
Titration: Make serial dilutions of positive screened IgG samples with PBS buffer (e.g. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320 etc.).
 For example: Take 100μL of the 1/10 dilution, mix with 100μL of PBS to give a 1/20 dilution. Repeat for further dilutions.

- 8.3.4 Substrate slides. Allow substrate slide(s) to reach room temperature (18-28°C) prior to removal from pouch(es). Label slides appropriately, place in the humid chamber and add one drop of positive and negative control to wells 1 and 2 respectively. Add 25μL of diluted patient samples to the remaining wells.

- 8.3.5 Slide incubation. Incubate slides for 30 minutes in a humid chamber at room temperature (18-28°C).

- 8.3.6 PBS wash. Remove slides from humid chamber and rinse briefly with PBS squeeze bottle. Do not squirt directly on to the wells. Place slides in a rack and immerse in PBS and agitate or stir for 10 minutes.

- 8.3.7 Addition of fluorescent conjugate. Shake off excess PBS and blot around wells using blotters provided. Return slides to humid chamber and immediately cover each well with a drop of fluorescent conjugate. DO NOT LEAVE WELLS UNCOVERED FOR LONGER THAN 15 SECONDS. Drying out of the substrate seriously affects the results.

- 8.3.8 Slide incubation. Incubate slides for 30 minutes in a humid chamber at room temperature (18-28°C) in the dark.

- 8.3.9 PBS wash. Wash again as described in step 6. Optional counterstain: Add 2-3 drops of 1% Evans Blue per 100mL of PBS prior to slide immersion.

- 8.3.10 Mounting with coverslip. Remove one slide at a time from PBS wash. Quickly dry around the wells using blotters and add a drop of mounting medium to each well. Carefully lower the slide onto the coverslip, avoiding air bubbles, but if present do not attempt to remove. Carefully wipe up any excess mounting medium.

- 8.3.11 View slides under fluorescence microscope. Finished slides should be viewed as soon as possible, but may be stored at 2-8°C in the dark for up to one week, without significant loss of fluorescence.

9 RESULTS

9.1 Quality control

The positive control should give specific apple green kinetoplast staining with or without staining of the nucleus. The negative control should show dull green staining of the organism with no discernible fluorescence. If the controls do not appear as described the assay should be repeated.

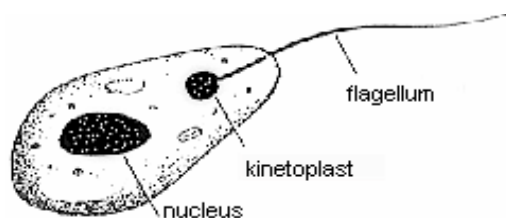
9.2 Interpretation of results

9.2.1 Negative

A sample is considered negative if specific kinetoplast staining is equivalent to or less than the negative control well, even if other structures such as the basal body, flagellum or nucleus stain.

9.2.2 Positive

A sample is considered positive if the kinetoplast staining is greater than the negative control. To clearly differentiate the kinetoplast from the nucleus, view the positive control well. The kinetoplast will always be located nearer the flagellum (see illustration below).



NB: Each laboratory should establish at which point a positive result is considered clinically significant.

INTERPRET RESULTS USING ONLY SINGLE, WELL-DEFINED ORGANISMS.

10 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 10.1 The light source, filters and optics of different makes of fluorescence microscope will influence test kit sensitivity. The performance of the microscope is significantly influenced by correct maintenance especially centring of the mercury vapour lamp and changing of the lamp after the recommended period of time.
- 10.2 Drug induced SLE patients may have dsDNA antibodies (ref. 5).
- 10.3 Patients undergoing steroid therapy may give negative results for dsDNA antibody (ref. 6).
- 10.4 Microbially contaminated serum should not be used, as false positive or negative results may occur.
- 10.5 If there appears to be an unusual amount of background staining or there is any difficulty in interpreting the results, the user may want to run a PBS control.
- 10.6 This kit is used to aid diagnosis only. A positive result suggests certain diseases which must be confirmed by clinical findings and other serological tests. The results obtained from this assay are not diagnostic proof of the presence or absence of disease.

FDA (USA) information – see front page. Slides are considered to be “Analyte Specific Reagents”. Except as a component of the dsDNA kits, analyte and performance characteristics are not established.

11 EXPECTED VALUES

C. luciliae substrate was used to test a variety of connective tissue disease patients and also 50 random normal blood donors. The results are given in the table below:

Patient group	Number	Positive <i>C. luciliae</i> staining
SLE	100	32
Rheumatoid Arthritis	10	0
Scleroderma	10	0
Sjögren's Syndrome	5	0
Normals	50	0

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Precision

Five slides from the same lot were tested with a known control sample which was diluted out to end-point. All five slides gave an end-point titre of 1/5120, demonstrating that there is no significant difference in performance between slides in the same batch. Three slides from different batches were tested with a known control sample which was diluted 1/25. All three slides gave an equivalent intensity of staining (2+).

12.2 Sensitivity

The sensitivity of the tests and the limit of detection are dependent on the microscope used. There is no international calibrator available for standardisation.

12.3 Specificity

46 sera known to contain high levels of antibodies to dsDNA and 50 normal sera were tested on The Binding Site *C. luciliae* kit and on an equivalent commercially available IFA kit. Staining was classified as positive (+), strong positive (2+) and negative (-):

Comparison kit	The Binding Site		
	2+	+	-
	23	8	0
	1	14	0
	0	0	50

13 REFERENCES

1. Aarden, L.A.; de Groot, E. R.; Felkamp, T.E.W. (1975): Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae*, a sample substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sci. 254: 505-515.
2. 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.
3. Sontheimer, R.D.; Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab. Clin. Med. 91: 550-558.
4. Weller, T.H.; Coons, A.H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in Vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789-794.
5. Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J. Rheum. 2: 215-220.
6. Ballou, S.P.; Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
7. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A Milford Ward, J Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

14 SUMMARY OF PROCEDURE

- 14.1 Equilibrate mounting medium to room temperature.
- 14.2 Dilute PBS with distilled water.
- 14.3 Dilute patient sera 1/10 with PBS.
- 14.4 Remove slides from refrigerator and equilibrate to room temperature (18-28°C).
- 14.5 Remove slide from foil bag and place in a humid chamber. Add 25µL of controls and patient sera.
- 14.6 Incubate for 30 minutes at room temperature (18-28°C).
- 14.7 Rinse slides with a stream of PBS. Wash slides for 10 minutes in a rack.
- 14.8 Blot around each well, return slide to humid chamber and immediately add a drop of fluorescent conjugate.
- 14.9 Incubate slides for 30 minutes.
- 14.10 Wash again as described in step 7.
- 14.11 Blot around wells; add mounting media to each well and coverslip.
- 14.12 View slides under a fluorescence microscope.

1	Verwendungszweck
2	Einführung
3	Testprinzip
4	Reagenzien
5	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen
6	Lagerung und Stabilität
7	Probenentnahme und –vorbereitung
8	Testdurchführung
9	Ergebnisse
10	Grenzen des Tests
11	Erwartete Werte
12	Spezifische Leistungsdaten
13	Referenzen
14	Kurzarbeitsanleitung

CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA KIT UND OBJEKTTRÄGER

Nur zur *in vitro* Diagnostik

**Bestell-Nr.: FK002._
FS002._**

Hergestellt von:

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

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:

*The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A
D-68723 Schwetzingen, Deutschland
Telefonnummer: +49 (0) 6202 92 62 0
Fax: +49 (0) 6202 92 62 222
e-mail: office@bindingsite.de*



1 VERWENDUNGSZWECK

Die *Crithidia luciliae* Kits bzw. Objektträger dienen zum Nachweis und zur Titration von zirkulierenden Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA (dsDNA). Dieser Autoantikörper ist ein Marker für die Diagnose und Behandlung von Systemischem Lupus Erythematoses (SLE). Die Verwendung der Einzel-Objektträger mit anderen Detektionssystemen wurde nicht überprüft, ist aber nicht zwangsläufig ausgeschlossen.

2 EINFÜHRUNG

Desoxyribonucleinsäure kommt in der Natur in mindestens drei verschiedenen Formen vor: eine rechtsdrehende doppelsträngige Konformation (dsDNA), eine linksdrehende doppelsträngige Konformation (Z-DNA) und eine einzelsträngige Konformation (ssDNA). Alle Formen enthalten Determinanten gegen die Autoantikörper produziert werden können. Autoantikörper gegen dsDNA und ssDNA werden in der Regel bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen gefunden.

Antikörper gegen ssDNA (gegen die Basen des Nucleotids des DNA-Moleküls) treten nicht spezifisch bei einer Krankheit auf. Sie werden bei Patienten mit Rheumatischer Arthritis, SLE, Systemischer Sklerose und anderen nicht-immunologischen Erkrankungen gefunden. Sie sind ein Hauptbestandteil der meisten antinukleären Antikörper (ANA) und sind in der indirekten Immunfluoreszenz als homogene Färbung sichtbar.

Antikörper gegen dsDNA sind gegen das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat des DNA-Moleküls gerichtet. Diese Antikörper sind weniger häufig als Antikörper gegen ssDNA, haben aber aus zwei Gründen eine größere klinische Relevanz. 1. Hohe anti-dsDNA-Titer sind bisher nur bei SLE-Patienten gefunden worden. 2. Der Antikörper-Titer korreliert sehr gut mit dem Krankheitsverlauf. Dadurch hat man einen wichtigen Marker sowohl für die Schwere als auch den Verlauf der Erkrankung, da sich ein Behandlungserfolg daran ablesen lässt.

Es wurden im Verlauf der Jahre verschiedene Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen dsDNA verwendet, z.B. passive Agglutination, Komplementbindung und RIA. Der Blutflagellat *C. luciliae* wird als Substrat in Immunfluoreszenz-Tests verwendet, es ist ein sensibler und spezifischer Screening-Test. *C. luciliae* besitzt eine Organelle, die als Kinetoplast bezeichnet wird. Der Kinetoplast ist ein Riesens-Mitochondrium, das dsDNA, aber keine Histone oder andere nukleäre Säugetier-Antigene enthält (Ref. 1). Der Vorteil von *C. luciliae* beim Screening auf Antikörper gegen dsDNA ist die hohe Spezifität aufgrund der Zusammensetzung des Kinetoplasten (Ref. 2 & 3).

3 TESTPRINZIP

Der Test beruht auf der indirekten Immunfluoreszenz-Technik (Ref. 4). Die Patientenserum und geeignete Kontrollen werden mit den *C. luciliae* inkubiert. In einem Waschschriff werden die nicht reagierenden Antikörper entfernt und dann das Fluoreszein-Konjugat zugegeben. Überschüssiges Konjugat wird durch Waschen entfernt. Die Untersuchung der Objektträger erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Positive Proben zeigen im Bereich des Kinetoplasten eine apfelgrüne Fluoreszenz.

4 REAGENZIEN

4.1 Objektträger mit 5 oder 10 Auftragsstellen (Felder) mit *C. luciliae* als Substrat.

Gilt nur für Kits:

4.2 Positivkontrolle: zeigt eine Färbung des Kinetoplasten. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

- 4.3 **Negativkontrolle.** Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid. Gebrauchsfertig.
- 4.4 **Affinitätsgereinigte Schaf anti-human-IgG-(γ -Kette)-FITC-Konjugat** (FITC = Fluoreszein-Isothiocyanat). Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid. Gebrauchsfertig.
- 4.5 **1%ige Evans-Blue-Lösung:** zur optionalen Gegenfärbung.
- 4.6 **PBS-Puffer:** liegt als 20-fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch entsprechend verdünnt werden.
- 4.7 **Saugfähige Papierblotter** um nach dem Waschschrift die Objektträger optimal zu trocknen.
- 4.8 **Eindeckmedium:** ist speziell für die Immunfluoreszenz und enthält einen Ausbleich-Schutzfaktor (DABCO: 1,4 diazabicyclo [2,2,2] octan).
- 4.9 **Deckgläschen.**

5 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieses Produkt sollte nur von entsprechend geschultem Laborpersonal für den angegebenen Verwendungszweck verwendet werden. Die Einhaltung der Arbeitsvorschrift wird empfohlen.

Das Ausgangsmaterial zur Erstellung der Kontrollen stammt aus menschlichem Blut. Jede Einzelspende wurde mit Tests bezüglich Antikörpern gegen Human-Immunschwäche-Virus (HIV 1 & 2), Hepatitis-C-Virus und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) untersucht und als negativ befunden. Es gibt aber zur Zeit keine absolut sicheren Testmethoden zum Abschluss von HIV, Hepatitis C-Virus, Hepatitis B-Virus und anderen Infektionsträgern.

Deshalb sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Umgangs- und Entsorgungsmethoden sollten denen für potentiell infektiösem Material entsprechen und der Test nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

Die Evans-Blue-Lösung und die Kit-Kontrollen enthalten 0,099% Natriumazid als Konservierungsmittel. Deshalb sollten die entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden. Verschlucken sowie Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Nach Kontakt Hautstelle mit viel Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung mit ausreichender Menge Wasser nachspülen um Azidablagerungen zu vermeiden.

6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Die ungeöffneten Kits oder Objektträger sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nicht einfrieren! Nach dem Öffnen der Folienbeutel sollten die Objektträger sofort verwendet werden. Verdünnter PBS-Puffer kann bis zu einem Monat bei 2-8°C gelagert werden. Das FITC-Konjugat nach Möglichkeit nicht im Sonnenlicht, Fluoreszenz- oder UV-Licht stehenlassen. Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern.

7 PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Das Blut steril durch Venenpunktur entnehmen und bei Raumtemperatur gerinnen lassen. Das Serum so schnell wie möglich abtrennen um eine Hämolyse zu vermeiden. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 7 Tage vor dem Test gelagert werden (Ref. 7). Für eine längere Lagerung sollten die Proben aliquotiert und bei mindestens -20°C eingefroren werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Seren vermeiden. Keine stark lipämischen, hämolytischen oder mikrobiell verunreinigte Seren verwenden, da dadurch ein erniedrigter Titer oder ein unspezifisches Muster auftreten kann.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 Gelieferte Materialien (Kits)

50 Test-Kit FK002.1

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (10 x 5 Felder *C. luciliae* Objektträger)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (vorverdünnte Positivkontrolle)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (vorverdünnte Negativkontrolle)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (anti-human-IgG-(γ -Kette)-FITC-Konjugat)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1%ige Evans-Blue-Lösung)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS-Konzentrat, 20fach)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Eindeckmedium)
- 20 x *Blotters* (Blotter)
- 10 x *Coverslips* (Deckgläschen) (22 x 70mm)
- 1 x Arbeitsanleitung

250 Test-Kit FK002.2

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (25 x 10 Felder *C. luciliae* Objektträger)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (vorverdünnte Positivkontrolle)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (vorverdünnte Negativkontrolle)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (anti-human-IgG-(γ -Kette)-FITC-Konjugat)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1%ige Evans-Blue-Lösung)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS-Konzentrat, 20fach)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Eindeckmedium)
- 50 x *Blotters* (Blotter)
- 25 x *Coverslips* (Deckgläschen) (22 x 70mm)
- 1 x Arbeitsanleitung

Objektträger

- FS002.1 (10 x 5 Felder), FS002.2 (25 x 10 Felder), FS002.3 (100 x 10 Felder)
- 1 x Arbeitsanleitung

8.2 Benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

- 8.2.1 Destilliertes Wasser zum Verdünnen des PBS-Pufferkonzentrats.
- 8.2.2 Behälter für PBS-Puffer und Spritzflasche für PBS-Puffer.
- 8.2.3 Mikropipetten und Einmal-Spitzen zum Pipettieren von Patientenseren.
- 8.2.4 Feuchte Kammer für die Inkubation. (z.B. Magnetische Färgekammer, Bestell-Nr.: BD010).
- 8.2.5 Fluoreszenzmikroskop mit einem 495nm Anregungsfilter und 515nm Barrierefilter.
- 8.2.6 Bei Verwendung von Einzelobjektträger werden die folgenden Materialien benötigt: Positiv-Kontrollserum (Bestell-Nr. FA109), Negativ-Kontrollserum (Bestell-Nr. CON92), anti-human-IgG-(γ -Kette)-FITC-Konjugat (gebrauchsfertig, Bestell-Nr. FA004, oder Konzentrat (Bestell-Nr. AF004) das vor Gebrauch 1/100-1/400 verdünnt werden muss), PBS (Bestell-Nr. CON3.3), 1%ige Evans-Blue-Lösung (Bestell-Nr. CON93), Eindeckmedium (Bestell-Nr. CON 195.1/.2), Papierblotter und Deckgläschen.

8.3 Testdurchführung

Qualitätskontrolle

Die Negativ- und Positivkontrolle sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden. Es wird empfohlen, dass eine titrierbare Positivkontrolle verwendet wird.

- 8.3.1 **Eindeckmedium:** Das Eindeckmedium aus dem Kühlschrank nehmen und vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen.
- 8.3.2 **PBS-Konzentrat verdünnen.** PBS-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1/20 (1 Teil PBS-Pufferkonzentrat + 19 Teile destilliertes Wasser) verdünnen und mischen. Der gebrauchsfertige PBS-Puffer wird zum Verdünnen der Patientenseren und als Waschpuffer verwendet. Hinweis: Nur das gesamte Pufferkonzentrat verdünnen, wenn der Kit innerhalb von einem Monat verbraucht wird.
- 8.3.3 **Patientenseren verdünnen.**
Screening: Patientenseren im Verhältnis 1/10 verdünnen (z.B. 50 μ L Serum + 450 μ L PBS-Puffer)
Titration: Von im Screening positiven Proben eine serielle Verdünnungsreihe erstellen (z.B. 1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160 usw.). z.B. 100 μ L eines 1/10 verdünnten Patientenserums mit 100 μ L PBS-Puffer versetzen - ergibt eine 1/20 Verdünnung. Schritt für weitere Verdünnungen wiederholen.
- 8.3.4 **Substrat-Objektträger vorbereiten.** Die Objektträger vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) bringen. Folienbeutel erst direkt vor dem Gebrauch öffnen! Die Objektträger aus dem Folienbeutel nehmen, entsprechend beschriften und in eine feuchte Kammer geben. Je einen Tropfen der Positiv- und Negativkontrolle auftropfen und je 25 μ L der Patientenseren auf die jeweiligen Felder pipettieren.
- 8.3.5 **Inkubation der Objektträger.** Die Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur (18-28°C) in der feuchten Kammer inkubieren.
- 8.3.6 **Waschen mit PBS-Puffer.** Die Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen und rasch mit PBS-Puffer (Spritzflasche) waschen, dabei nicht direkt in die Auftragsfelder spritzen. Die Objektträger in eine Halterung geben und in ein PBS-Pufferbad eintauchen. Die Objektträger 10 min. im PBS-Puffer belassen, dabei rühren oder leicht schütteln.
- 8.3.7 **Zugabe von Fluoreszenz-Konjugat.** Überschüssigen PBS-Puffer abschütteln und die Objektträger mit dem mitgelieferten Blotpapier (nur Kits!) oder Filterpapier abtrocknen. Die Objektträger wieder in die feuchte Kammer legen und sofort, d. h. innerhalb von 15 sec, auf jede Auftragsstelle einen Tropfen Fluoreszenz-Konjugat geben. Das Austrocknen des Substrats kann das Ergebnis beträchtlich beeinträchtigen.

- 8.3.8 Inkubation der Objektträger. Die Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur (18-28°C) in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren.
- 8.3.9 Waschen mit PBS-Puffer. Erneut waschen wie unter Punkt 8.3.6 beschrieben. Wenn eine Gegenfärbung gewünscht wird, können bei diesem Waschschrift 2-3 Tropfen einer 1%igen Evans-Blue-Lösung pro 100mL PBS-Puffer zugegeben werden.
- 8.3.10 Deckgläschen aufsetzen. Jeweils nur einen Objektträger aus dem PBS-Pufferbad nehmen. Um die Auftragsstellen herum rasch abtrocknen und jeweils 1 Tropfen Eindeckmedium auf die Auftragsstelle geben. Das Deckgläschen sorgfältig auf den Objektträger legen, wobei Luftbläschen zu vermeiden sind. Eventuell vorhandene Luftblasen nicht versuchen zu entfernen. Überschüssiges Eindeckmedium mit Filterpapier entfernen.
- 8.3.11 Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Fertiggestellte Objektträger so schnell wie möglich auswerten. Sie können im Dunkeln bei 2-8°C bis zu einer Woche ohne signifikanten Fluoreszenzverlust aufbewahrt werden.

9 ERGEBNISSE

9.1 Qualitätskontrolle

Die Positivkontrolle sollte eine spezifische apfelgrüne Färbung des Kinetoplasten mit oder ohne Anfärbung des Kerns zeigen. Die Negativkontrolle sollte eine matt-grüne Färbung des gesamten Organismus ohne erkennbare Fluoreszenz zeigen. Erscheinen die Kontrollen nicht wie beschrieben, sollte der Test verworfen und wiederholt werden.

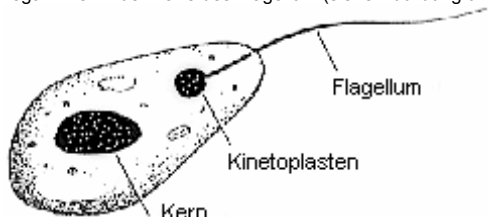
9.2 Interpretation der Ergebnisse

9.2.1 Negativ

Eine Probe wird als negativ betrachtet, wenn die Anfärbung des Kinetoplasten gleich oder schwächer als die der Negativkontrolle ist. Dies gilt auch wenn Strukturen wie Basalkörper, Flagellum oder Kern angefärbt sind.

9.2.2 Positiv

Eine Probe wird als positiv betrachtet, wenn die Anfärbung des Kinetoplasten stärker als bei der Negativkontrolle ist. Um den Kinetoplasten eindeutig vom Kern zu unterscheiden die Positivkontrolle gründlich betrachten. Der Kinetoplast liegt immer in der Nähe des Flagellum (siehe Abbildung unten).



Hinweis: Jedes Labor sollte eigene Richtlinien erstellen und festlegen wann ein positives Ergebnis klinisch relevant ist.

ZUR INTERPRETATION DER ERGEBNISSE IMMER NUR EINZELNE GUT SICHTBARE ORGANISMEN VERWENDEN.

10 GRENZEN DES TESTS

- 10.1 Die im Fluoreszenzmikroskop verwendete Lichtquelle, Filter und Optik beeinflussen die Sensitivität des Tests. Die Qualität des Mikroskops wird maßgeblich durch die korrekte Wartung, speziell durch das Zentrieren der Quecksilberlampe und deren Austausch nach der empfohlenen Brenndauer, beeinflusst.
- 10.2 Patienten mit Medikamenten-induziertem SLE können auch Antikörper gegen dsDNA haben (Ref. 5).
- 10.3 Patienten, die mit einer Steroid-Therapie behandelt werden, können negativ für Antikörper gegen dsDNA sein (Ref. 6).
- 10.4 Mikrobiologisch verunreinigte Seren sollten nicht verwendet werden, da dadurch falsch positive oder falsch negative Ergebnisse erzeugt werden können.
- 10.5 Falls eine ungewöhnlich starke Hintergrundfärbung auftritt oder andere Schwierigkeiten bei der Ergebnisinterpretation auftreten, wird empfohlen PBS-Puffer zur Kontrolle aufzutragen.
- 10.6 Dieser Test allein ist nicht als diagnostischer Beweis ausreichend. Alle Ergebnisse sollten immer nur im Zusammenhang mit anderen serologischen Laborbefunden und dem klinischen Bild des Patienten betrachtet werden.

FDA (USA) Informationen: siehe englische Packungsbeilage.

11 ERWARTETE WERTE

C. luciliae Objektträger wurden verwendet um Seren von Patienten mit verschiedenen Bindegewebserkrankungen und 50 Seren von gesunden, willkürlich ausgewählten Blutspendern zu testen. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle zusammengefasst:

Patientengruppe	Anzahl	Positive <i>C. luciliae</i> Anfärbung
SLE	100	32
Rheumatische Arthritis	10	0
Sklerodermie	10	0
Sjögrens Syndrom	5	0
Normale	50	0

12 LEISTUNGSDATEN

12.1 Präzision

5 Objektträger einer Charge wurden mit einem bekannten Kontrollserum, das bis zum Endpunkt titriert wurde, getestet. Bei allen 5 Objektträgern betrug der End-Titer 1/5120. Dies zeigt, dass es keine nennenswerten Unterschiede innerhalb einer Charge gibt. Drei Objektträger von unterschiedlichen Chargen wurden mit einer bekannten Kontrolle (1/25 verdünnt) getestet. Alle drei Objektträger zeigten eine vergleichbare Färbungsintensität von 2+.

12.2 Sensitivität

Die Sensitivität des Tests und die Erkennungsgrenze sind durch die Qualität des verwendeten Mikroskops limitiert. Es steht kein internationaler Kalibrator für eine Standardisierung zur Verfügung.

12.3 Spezifität

46 bekannte Seren mit hohen dsDNA-Antikörper-Konzentrationen und 50 normale Seren wurden mit dem The Binding Site *C. luciliae* Kit und einem vergleichbaren kommerziellen Kit getestet. Die Färbung wurde als positiv (+), stark positiv (2+) und negativ (-) bewertet.

Alternativer Kit	The Binding Site Kit		
	2+	+	-
2+	23	8	0
+	1	14	0
-	0	0	50

13 REFERENZEN

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

14 KURZARBEITSANLEITUNG

- Eindeckmedium auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
- PBS-Pufferkonzentrat 1/20 mit destilliertem Wasser verdünnen.
- Patientenseren 1/10 mit PBS-Puffer verdünnen.
- Objektträger aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen.
- Objektträger aus der Folientasche nehmen und in eine feuchte Kammer legen. Je 25µL Kontrollen und Patientenseren auftragen.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-28°C) inkubieren.
- Objektträger mit PBS-Puffer waschen: Erst mit der Spritzflasche kurz spülen, dann 10 min. in einem PBS-Pufferbad eintauchen.
- Objektträger aus dem PBS-Bad nehmen, um die Auftragsstellen herum gut abtrocknen, wieder in die feuchte Kammer legen und sofort FITC-Konjugat auftropfen.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur (abdunkeln) inkubieren.
- Wie unter Punkt 7 beschrieben waschen.
- Objektträger aus dem PBS-Bad nehmen, um die Auftragsstellen herum gut abtrocknen, auf jede Auftragsstelle Eindeckmedium auftropfen und ein Deckgläschen aufsetzen.
- Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten.

1	Indications
2	Présentation générale
3	Principe
4	Réactifs
5	Précautions
6	Stockage et stabilité
7	Echantillons
8	Procédure
9	Résultats
10	Limites de la procédure
11	Valeurs attendues
12	Performances
13	Bibliographie
14	Résumé de la technique

COFFRETS DE DEPISTAGE DES ANTICORPS ANTI-ADN DOUBLE BRIN SUR CRITHIDIA LUCILIAE

Pour un usage en diagnostic *in vitro*

**Références : FK002._
FS002._**

Produit fabriqué en Angleterre par la société :
The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, United Kingdom.
www.bindingsite.co.uk

Distribués en France par la société :
The Binding Site, 14 rue des Glairaux, BP226, 38522 Saint-Egrève Cedex.
Téléphone : 04.38.02.19.19
Fax : 04.38.02.19.20
e-mail : Binding.Site@wanadoo.fr



1 INDICATIONS

Ces réactifs (coffrets ou lames) sont destinés au dépistage et à la détermination semi-quantitative d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin (ADN db) par immunofluorescence indirecte sur des lames de Crithidia luciliae. Ils apportent une aide au diagnostic et au traitement du lupus érythémateux disséminé (LED).

2 PRESENTATION GENERALE

L'acide déoxyribonucléique existe naturellement sous trois formes différentes : une conformation double brin droite (ADN db), une conformation double brin gauche (ADN Z) et une conformation simple brin (ADN sb). Toutes ces formes contiennent des déterminants antigéniques contre lesquels des auto-anticorps peuvent être produits. Des auto-anticorps contre l'ADN db ou l'ADN sb sont couramment présents chez des patients atteints de maladies autoimmunes.

Les anticorps anti-ADN sb (dirigés contre les nucléotides de la molécule d'ADN) ne sont pas spécifiques d'une maladie particulière et peuvent être rencontrés chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, LED, de sclérose disséminée ou d'autres désordres non immunologiques. Ils représentent la plupart des anticorps anti-nucléaires (ANA) avec un aspect homogène en immunofluorescence indirecte.

Les anticorps anti-ADN db sont dirigés contre le squelette de la molécule d'ADN : le déoxyribose phosphate. Ils sont moins communs que les anticorps anti-ADN sb mais ont une signification clinique plus importante pour deux raisons principales. Premièrement, des titres élevés en anti-ADN db sont trouvés uniquement chez des patients atteints de LED et deuxièmement, les titres d'anticorps sont bien corrélés avec l'activité de la maladie. Ce sont des marqueurs importants de la gravité de la maladie et du degré de réponse à un traitement.

Plusieurs méthodes ont été utilisées ces dernières années pour la détection des autoanticorps anti-ADN db, comme l'agglutination passive, la fixation du complément et la RIA. L'utilisation du protozoaire C. luciliae comme substrat en immunofluorescence indirecte est un test de dépistage spécifique et sensible. Les C. luciliae possèdent une organelle appelé kinétoplaste. C'est une mitochondrie géante contenant exclusivement de l'ADN db (réf. 1) sans histone et sans autre antigène de mammifères. L'avantage des C. luciliae pour le dépistage des autoanticorps anti-ADN db est sa spécificité, liée à la composition du kinétoplaste (réfs 2 et 3).

3 PRINCIPE

Ces produits font appel à une technique d'immunofluorescence indirecte (réf. 4). Les sérums de patients et les contrôles sont incubés en présence de C. luciliae comme substrat. Les anticorps non spécifiques sont éliminés par lavage. Un marqueur fluorescent permet de révéler les autoanticorps spécifiques. La lecture des lames s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. La positivité des échantillons pour l'ADN db se traduit par un marquage fluorescent vert du kinétoplaste.

4 REACTIFS

4.1 Lames recouvertes de C. luciliae (5 ou 10 puits).

Les coffrets contiennent :

4.2 Sérum contrôle positif : donnant un marquage du kinétoplaste. Il est fourni pré-dilué et contient 0,099% d'azide de sodium.

4.3 Sérum contrôle négatif : Il est fourni pré-dilué et contient 0,099% d'azide de sodium.

- 4.4 Antisérums de mouton anti-IgG (chaîne gamma) humaines, purifiés par affinité et couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Il est fourni pré-dilué et contient 0,099% d'azide de sodium.
- 4.5 Solution de bleu d'Evans à 1%.
- 4.6 Solution liquide de tampon PBS concentrée 20 fois.
- 4.7 Buvards pour sécher le pourtour des puits.
- 4.8 Milieu de montage, contenant un agent « anti-fading » (DABCO, 1,4 diazabicyclo(2.2.2)octane).
- 4.9 Lamelles.

5 PRECAUTIONS

Tous les sérums des donneurs humains ont été soumis aux tests de recherche d'antigène HBs et d'anticorps anti-HCV, anti-HIV1 et HIV2 et se sont avérés négatifs. Toutefois ces tests ne peuvent garantir l'absence totale d'agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés par un personnel avisé.

Ce réactif doit être utilisé par un personnel adéquat. Il est recommandé de suivre scrupuleusement la procédure.

Les composants du coffret contiennent 0,099% d'azide de sodium. Il est donc nécessaire de les manipuler avec précaution. Ne pas ingérer ou mettre en contact avec la peau ou les muqueuses. En cas de contact, laver à grande eau et consulter un médecin. Des azides de métaux explosifs peuvent se former avec le cuivre et le plomb. Laver à grande eau les récipients ayant contenu ces réactifs afin d'éviter la formation des azides.

6 STOCKAGE ET STABILITE

Les coffrets non ouverts doivent être stockés à 2-8°C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. NE PAS CONGELER. Lorsque les lames sont sorties de leur étui, les utiliser immédiatement. Le tampon dilué peut être stocké jusqu'à un mois à 2-8°C. Le conjugué FITC doit être conservé à l'obscurité. Tous les autres réactifs doivent être stockés à 2-8°C.

7 ECHANTILLONS

Utiliser du sérum. Laisser le sang coaguler à température ambiante, puis séparer le sérum du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les sérums peuvent être conservés à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests (réf. 7) ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue. Les congélations et décongélations successives doivent être évitées. Il est recommandé d'utiliser des sérums non lipidiques, non hémolysés et non contaminés par des bactéries qui peuvent donner des aspects peu nets ou diminuer les titres.

8 PROCEDURE

8.1 Matériel fourni

Coffret pour 50 tests (réf. FK002.1)

- 10 x *Crithidia slide – 5-well* (10 lames de 5 puits recouverts de *C. luciliae*)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (contrôle positif prêt à l'emploi)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (contrôle négatif prêt à l'emploi)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (conjugué FITC AFF anti-IgG (γ) humaines)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (solution de bleu d'Evans à 1%)
- 2 X 60mL *PBS concentrate* (solution de PBS concentrée 20 fois)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (milieu de montage)
- 20 *Blotters* (buvards)
- 10 *Coverslips* (lamelles) (22 x 70mm)
- 1 fiche technique

Coffret pour 250 tests (réf. FK002.2)

- 25 x *Crithidia slide – 10-well* (25 lames de 10 puits recouverts de *C. luciliae*)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (contrôle positif prêt à l'emploi)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (contrôle négatif prêt à l'emploi)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (conjugué FITC AFF anti-IgG (γ) humaines)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (solution de bleu d'Evans à 1%)
- 2 X 60mL *PBS concentrate* (solution de PBS concentrée 20 fois)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (milieu de montage)
- 50 *Blotters* (buvards)
- 25 *Coverslips* (lamelles) (22 x 70mm)
- 1 fiche technique

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- Lames 10 x 5 puits, lames 25 x 10 puits, lames 100 x 10 puits respectivement
- 1 x fiche technique

8.2 Matériel nécessaire et non fourni

- 8.2.1 Eau distillée pour diluer le PBS concentré.
- 8.2.2 Un flacon pour contenir le PBS dilué et pissette pour les lavages au PBS.
- 8.2.3 Micropipettes pour le dépôt des échantillons.
- 8.2.4 Chambre humide pour les étapes d'incubation.
- 8.2.5 Microscope à fluorescence.
- 8.2.6 Si seules les lames sont fournies, il est nécessaire d'avoir par ailleurs un contrôle positif (réf. FA109), un contrôle négatif (réf. CON 92), un conjugué FITC (réf. FA004, pré-dilué prêt-à- l'emploi, ou AF004, à diluer au 1/100 - 1/400), du PBS (réf. CON 3.3), du bleu d'Evans (CON93), du milieu de montage (réf. CON 195.1/2), des buvards, des lamelles.

8.3 Procédure

Contrôle de qualité

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être déposés lors de chaque série. Il est également recommandé d'utiliser un contrôle titré pour chaque essai.

- 8.3.1 Milieu de montage : Sortir le milieu de montage du réfrigérateur pour qu'il atteigne la température ambiante (18-28°C) avant d'être utilisé.
- 8.3.2 Diluer le PBS concentré. Diluer le PBS concentré dans de l'eau distillée (1 volume de PBS pour 19 volumes d'eau) et mélanger. Le PBS est utilisé pour diluer les échantillons et comme tampon de lavage. NB : Ne diluer que le volume nécessaire à la manipulation.
- 8.3.3 Dilution des échantillons
Pour le dépistage, diluer les échantillons au 1/10 (mettre 50µL de sérum dans 450µL de PBS dilué).
Pour la titration, faire une gamme de dilution du sérum en PBS (1/20, 1/40, 1/80, 160, 1/320...).
- 8.3.4 Lames. Les ramener à température ambiante (18-28°C) avant de les sortir de leur emballage. Les marquer puis les déposer dans la chambre humide avant le dépôt du contrôle positif et du contrôle négatif (1 goutte) dans les puits 1 et 2. Déposer 25µL d'échantillon dilué dans les autres puits.
- 8.3.5 Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante.
- 8.3.6 Lavage. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer rapidement à l'aide d'une pissette contenant du tampon PBS. Ne pas diriger le jet directement sur les puits. Mettre les lames sur un poir et les immerger en PBS sous agitation lente pendant 10 minutes.
- 8.3.7 Conjugué fluorescent. Eliminer l'excès de PBS et sécher le pourtour des puits à l'aide des buvards fournis. Remettre les lames en chambre humide et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué fluorescent. NE PAS LAISSER LES PUIITS A L'AIR PENDANT PLUS DE 15 SECONDES. Le dessèchement des puits affecte le résultat.
- 8.3.8 Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante. Recouvrir la chambre humide de papier afin d'éviter l'exposition à la lumière.
- 8.3.9 Lavage. Procéder comme à la section 8.3.6. Il est possible d'ajouter 2 ou 3 gouttes de bleu d'Evans à 1% à 100mL de PBS. Ceci permettra une contre coloration.
- 8.3.10 Montage des lames. Sortir les lames une à une du PBS. Sécher rapidement le pourtour des puits puis déposer une goutte de milieu de montage dans chaque puits. Déposer la lamelle en évitant la formation de bulles d'air. N'essayer pas d'éliminer les bulles d'air éventuellement apparues. Essuyer l'excès de milieu de montage.
- 8.3.11 Lecture des lames. La lecture se fait à l'aide d'un microscope fluorescent le plus rapidement possible. Cependant il est possible de les stocker une semaine à 2-8°C à l'obscurité sans affecter l'intensité de la fluorescence.

9 RESULTATS

9.1 Contrôle qualité

Le contrôle positif doit donner un marquage spécifique du kinétoplaste avec ou sans marquage du noyau. Le contrôle négatif ne doit pas montrer de fluorescence nette. Si les puits de contrôle donnent des résultats atypiques, le test doit être considéré comme invalide et il est conseillé de le répéter.

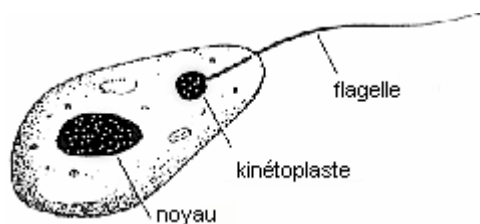
9.2 Interprétation des résultats

9.2.1 Négatif

Un échantillon est considéré négatif si le marquage spécifique du kinétoplaste est équivalent ou inférieur à celui obtenu avec le contrôle négatif. Le marquage d'autres structures comme la membrane basale, le flagelle ou le noyau, en absence de marquage du kinétoplaste, doit être considéré comme un résultat négatif.

9.2.2 Positif

Un échantillon est considéré positif si le marquage du kinétoplaste est supérieur à celui du contrôle négatif. Tous les échantillons positifs doivent être titrés jusqu'au point final (c'est-à-dire la dernière dilution qui donne une réaction positive). Pour différencier clairement le kinétoplaste du noyau, regarder le contrôle positif. Le kinétoplaste est toujours localisé près du flagelle (cf. illustration ci-dessous).



Note : Chaque laboratoire doit établir son seuil de positivité par rapport à la clinique.

L'INTERPRETATION DES RESULTATS DOIT ETRE FAITE A PARTIR D'UN ORGANISME UNIQUE ET CLAIREMENT DEFINI.

10 LIMITES DE LA PROCEDURE

- 10.1 La qualité des filtres, des optiques et de la source lumineuse peut influencer la sensibilité du test.
- 10.2 Les patients dont le LED est induit par des médicaments peuvent avoir des anticorps anti-ADN db (réf. 5).
- 10.3 Des patients suivant une thérapie avec des stéroïdes peuvent donner des résultats négatifs en anticorps anti-ADN db (réf. 6).
- 10.4 Des sérums contaminés par des agents microbiens ne doivent pas être utilisés, ils peuvent donner des résultats faussement positifs ou négatifs.
- 10.5 S'il apparaît un fond trop marqué ou si l'utilisateur a des difficultés pour l'interprétation des résultats, il est conseillé d'utiliser un contrôle PBS.
- 10.6 Ce coffret est utilisé pour apporter une aide au diagnostic. Un résultat positif suggère certaines maladies qui doivent être confirmées par la clinique ainsi que par d'autres tests sérologiques. Les résultats obtenus à partir de ce test ne sont pas une preuve diagnostic de la présence ou l'absence de maladies.

Informations FDA : Voir première page.

11 VALEURS ATTENDUES

Le substrat *C. luciliae* a été utilisé pour tester de nombreux patients atteints de connectivites et 50 donneurs sains. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Groupe de patients	Nombre	Marquage positif sur <i>C. luciliae</i>
LED	100	32
Arthrite rhumatoïde	10	0
Sclérodémie	10	0
Syndrome de Sjögren	5	0
Personnes saines	50	0

12 PERFORMANCES

12.1 Précision

Un contrôle positif ADN double brin a été déposé sur 5 lames d'un même lot et a été titré jusqu'à son point final sur chaque lame. Pour les 5 lames la dilution finale est de 1/5120 ce qui montre qu'il n'existe pas de variation significative à l'intérieur d'un même lot. Un sérum positif interne ADN double brin dilué au 1/25 a été déposé sur 3 lames de différents lots. Les 3 lames donnent la même intensité de fluorescence (2+).

12.2 Sensibilité

La sensibilité des tests et la limite de détection sont dépendantes de la qualité du microscope utilisé. Il n'existe pas de calibrateur international connu pour une standardisation.

12.3 Spécificité

46 sérums « positifs » pour l'ADN double brin et 50 sérums « négatifs » ont été testés sur des coffrets de *C. luciliae* de The Binding Site et d'un autre fabricant. Un marquage + est considéré comme positif, 2+ comme fortement positif et - comme négatif. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Autre fabricant	Coffret The Binding Site		
	2+	+	-
	23	8	0
	1	14	0
	0	0	50

13 BIBLIOGRAPHIE

1. Aarden, L.A.; de Groot, E. R.; Felkamp, T.E.W. (1975): Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sci. 254: 505-515.
2. 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.
3. Sontheimer, R.D.; Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab. Clin. Med. 91: 550-558.
4. Weller, T.H.; Coons, A.H (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789-794.
5. Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J. Rheum. 2: 215-220, 1975.
6. Ballou, S.P.; Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
7. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A Milford Ward, J Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

14 RESUME DE LA TECHNIQUE

- 14.1 Placer le milieu de montage à température ambiante.
- 14.2 Diluer le PBS concentré avec de l'eau distillée.
- 14.3 Diluer les sérums de patients au 1/10 en PBS.
- 14.4 Sortir les lames du réfrigérateur et les ramener à température ambiante (18-28°C), sans les sortir de leur emballage.
- 14.5 Sortir les lames de leur emballage aluminium et placer les dans une chambre d'incubation. Déposer 25µL de contrôles et de sérums de patients.
- 14.6 Incuber 30 minutes à température ambiante (18-28°C).
- 14.7 Rincer les lames avec un jet de PBS. Laver les lames 10 minutes dans du PBS sur un portoir.
- 14.8 Essuyer le pourtour des puits à l'aide des buvards. Remettre les lames dans la chambre humide et ajouter immédiatement une goutte de conjugué fluorescent.
- 14.9 Incuber les lames 30 minutes.
- 14.10 Laver à nouveau comme indiqué en 7.
- 14.11 Sécher le pourtour des puits, ajouter du milieu de montage à chaque puits et recouvrir la lame d'une lamelle.
- 14.12 Regarder les lames sous un microscope à fluorescence.

1	Aplicación
2	Introducción
3	Fundamento
4	Reactivos
5	Advertencias
6	Almacenamiento y estabilidad
7	Preparación de las muestras
8	Metodología
9	Resultados
10	Limitaciones del procedimiento
11	Valores esperados
12	Características de funcionamiento
13	Bibliografía
14	Resumen del procedimiento

Para el diagnóstico *in-vitro*

**Código del Producto: FK002._
FS002._**

Fabricado en Inglaterra por:

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

Teléfono: +44 (0)121 436 1000

Fax: +44 (0)121 430 7016

e-mail: info@bindingsite.co.uk

**1 APLICACIÓN**

Este producto (kit o portas) es para el uso en el screening y titulación de autoanticuerpos circulantes anti DNA de doble cadena (dsDNA). Este autoanticuerpo es un marcador para el diagnóstico y tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES). Para portas vendidos por separado, no se ha comprobado su eficacia con otros sistemas de detección, no quedando necesariamente excluidos.

2 INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico se encuentra en la naturaleza como mínimo en tres formas diferentes: una conformación de doble cadena de giro a la derecha (dsDNA), una conformación de doble cadena de giro a la izquierda (Z-DNA) y una conformación de cadena única (ssDNA). Todas las formas contienen determinantes contra los anticuerpos que puedan producirse. Los autoanticuerpos dsDNA y ssDNA se encuentran en pacientes con enfermedades autoinmunitarias.

Los anticuerpos a ssDNA (contra las bases del nucleótido de la molécula del DNA) no son a una enfermedad específica. Estos se encuentran en pacientes con artritis reumatoide, LES, esclerosis sistémica u otros desórdenes no-inmunológicos. Estos son un componente principal de los principales anticuerpos antinucleares (ANA) y son de patrones homogéneos visibles bajo inmunofluorescencia indirecta.

Los anticuerpos a dsDNA son contra la columna de fosfato desoxirribosa de la molécula de DNA. Estos son menos comunes que los anticuerpos a ssDNA, pero son por dos motivos clínicamente más significantes: 1. Títulos altos de anti-dsDNA sólo se han encontrado en pacientes con LES y 2. Los títulos de anticuerpos tienen buena correlación con el curso de la enfermedad. Con ello se obtiene un marcador importante tanto por la gravedad de la enfermedad como el curso de esta, dado que puede medirse el éxito del tratamiento.

Con el tiempo se han empleado diferentes métodos para la detección de anticuerpos a dsDNA, tales como la aglutinación pasiva, fijación de complemento y RIA. El hemoflagelo, *C. luciliae* se utiliza como sustrato en tests de inmunofluorescencia indirecta que es un test sensitivo y específico de screening. El *C. luciliae* posee un organelo llamado cinetoplasto. El cinetoplasto es una mitocondria gigante que contiene dsDNA (ref. 1) y no histonas u otros antígenos nucleares de mamíferos. La ventaja de *C. Luciliae* en el screening de anticuerpos a dsDNA es su especificidad debido a la composición de los cinetoplastos (ref. 2 y 3).

3 FUNDAMENTO

El test se basa en la inmunofluorescencia indirecta (ref. 4). Tanto las muestras como los controles correspondientes se incuban con *C. luciliae* como sustrato y mediante lavado se eliminan los anticuerpos que no han reaccionado y después se aplica el conjugado de fluorescencia apropiado. El conjugado no ligado se elimina mediante lavado. Los portas son examinados bajo un microscopio de fluorescencia dando las muestras positivas de dsDNA una fluorescencia de verde manzana en los cinetoplastos.

4 REACTIVOS

4.1 Portas con sustrato de *C. luciliae* de 5 ó 10 pocillos.

Sólo para kits:

4.2 Suero de control positivo dando una fluorescencia en los cinetoplastos, conteniendo azida sódica 0,099%. Prediluido y listo para el empleo.

4.3 Suero de control negativo conteniendo azida sódica 0,099%. Prediluido y listo para el empleo.

- 4.4 Conjugado FITC de IgG anti-humano de cordero purificado por afinidad (cadena gamma) conteniendo azida sódica 0,099%. Prediluido y listo para el empleo.
- 4.5 Azul de Evans 1%, como colorante opcional.
- 4.6 Tampón (PBS), suministrado en forma líquida concentrado 20 veces.
- 4.7 Secantes para secar alrededor de los pocillos.
- 4.8 Medio de montaje, conteniendo un agente anti-fading (DABCO, 1, 4, diazabicyclo [2.2.2] octano).
- 4.9 Cubreobjetos.

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- 10 portas de 5 pocillos, 25 portas de 10 pocillos, 100 portas de 10 pocillos respectivamente
- 1 x instrucciones de empleo

8.2 Materiales necesarios y no suministrados

- 8.2.1 Agua destilada para diluir el PBS.
- 8.2.2 Recipientes y botella de plástico para el tampón PBS.
- 8.2.3 Pipetas y tubos de reacción desechables.
- 8.2.4 Cámara húmeda para los pasos de incubación (p. ej. cámara de tinción magnética, N° de artículo BD010).
- 8.2.5 Microscopio de campo oscuro con filtros para una longitud de onda de excitación de 495nm y emisión de 515nm.
- 8.2.6 En caso de utilizar sólo portas con sustrato, los materiales siguientes también serán necesarios. Los códigos de artículo de The Binding Site se indican en paréntesis. controles positivos (FA109), control negativo (CON 92), conjugado FITC IgG anti-humano (cadena gamma) (FA004, prediluido y listo para el empleo o AF004, prediluir antes del empleo a 1/100 - 1/400) PBS (CON3.3), Azul de Evans (CON93 opcional), medio de montaje (CON195.1/2), secantes y cubreobjetos.

8.3 Procedimiento del ensayo

Control de calidad

Cada vez que se realice una serie de análisis deberán usarse controles positivo y negativo. Se recomienda efectuar un control de titulación con cada prueba que se realice.

- 8.3.1 Medio de montaje: Antes de su empleo, sacar el medio de montaje del refrigerador y dejar que llegue a temperatura ambiente (18-28°C) por sí solo.
- 8.3.2 Preparación PBS concentrado. Diluir el PBS concentrado con agua destilada (1 parte PBS + 19 partes de agua destilada) y mezclar. Nota: Preparar la totalidad del kit, sólo si va a utilizarse en un plazo de un mes a partir de la fecha de la preparación. El PBS se emplea para la dilución de las muestras de suero y como tampón.
- 8.3.3 Dilución muestras de pacientes.
Screening: Diluir muestras de pacientes 1/10 (p. ej. 50µL de suero + 450µL de tampón PBS).
Titulación: Hacer diluciones en serie de las muestras positivas examinadas por screening con (p. ej. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 etc.).
 Ejemplo: Mezclar 100µL de la dilución 1/10 y 100µL de PBS para obtener una dilución de 1/20 y así sucesivamente.
- 8.3.4 Preparación de los portas. Sacar los portas del refrigerador aproximadamente 30 minutos antes de su empleo para que alcancen la temperatura ambiente (18-28°C). ¡Abrir el embalaje, sólo antes de su utilización inmediata! Manipular con cuidado los portas con el fin de evitar daños en el sustrato. Colocar los portas correspondientemente marcados en la cámara húmeda y colocar una gota de los controles positivos en 2 pocillos, una gota de control negativo en otro y en los restantes 25 µl de cada muestra de pacientes.
- 8.3.5 Incubación de los portas. Incubar los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-28°C).
- 8.3.6 Lavado con PBS. Extraer el/los portas de la cámara húmeda y aclarar con cuidado con el frasco lavador. ¡No dirigir el chorro directamente a los pocillos! Después, sumergir en PBS los portas en la bandeja de tinción y agitar suavemente durante 10 minutos.
- 8.3.7 Adición de conjugado de fluorescencia. Sacudir el exceso de PBS y volver a introducir los portas en la cámara húmeda y secar alrededor de los pocillos. Colocar los portas de nuevo en la cámara húmeda e inmediatamente aplicar en cada pocillo una gota de conjugado de fluorescencia. NO DEJAR LOS POCILLOS SIN TAPAR MAS DE 15 SEGUNDOS. SI SE LLEGARA A SECAR EL SUBSTRATO, LOS RESULTADOS SE VERÍAN SERIAMENTE AFECTADOS.
- 8.3.8 Incubación de los portas. Incubar los portas durante 30 minutos en la cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28°C) y a oscuras.
- 8.3.9 Lavado con PBS. Lavar otra vez tal y como se describe en el paso 8.3.6. Contra-coloración opcional: añadir 2-3 gotas de Azul de Evans 1% por cada 100mL de PBS antes de la inmersión.
- 8.3.10 Colocación del cubreobjetos. Sacar de uno en uno los portas del PBS. Secar rápidamente alrededor de los pocillos y añadir una gota del medio de montaje a cada pocillo. Cubrir con cuidado el porta con el cubreobjetos evitando la formación de burbujas. ¡En caso de formarse burbujas, no intente quitarlas!
- 8.3.11 Visión de los portas bajo el microscopio de fluorescencia. Los portas deberán visionarse lo más pronto posible, pero pueden guardarse a una temperatura de 2-8°C hasta 1 semana sin mermas significantes de fluorescencia.

5 ADVERTENCIAS

El material de partida para la elaboración de los calibradores y controles proviene de sangre humana (sólo los kits). Cada una de las muestras han sido examinadas y libres de anticuerpos del virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (HIV 1 & 2), Hepatitis C así como antígenos superficiales de Hepatitis B (HBsAG). No obstante, hasta la fecha no existen métodos seguros para la exclusión de estos agentes infecciosos ni de otros. Por lo tanto, deben tratarse los reactivos como potencialmente infecciosos. Tanto la manipulación como los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa de materiales infecciosos y sólo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

Esta prueba sólo deberá efectuarse para el propósito indicado y por personal de laboratorio adecuadamente instruido.

Algunos kits contienen azida sódica 0,099% y deben tratarse según las medidas de seguridad correspondientes. Debe evitarse tanto la ingesta como el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, aclarar con abundante agua y consultar a un médico. La azida sódica puede formar azidas metálicas explosivas en contacto prolongado con tubos de plomo o cobre. Tras la eliminación aclarar con gran cantidad de agua con el fin de evitar depósitos de azida.

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit/los portas sin estrenar son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase almacenándolos entre 2 y 8°C. ¡NO CONGELAR! Tras la extracción de los portas de su embalaje deberán ser empleados inmediatamente. El tampón PBS diluido es estable hasta un mes a una temperatura entre 2 y 8°C. El conjugado FITC del kit debe ser resguardado de la luz solar, fluorescente o UV. Todos los reactivos deben almacenarse entre 2 y 8°C.

7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de suero se deben recolectar mediante extracción intravenosa y dejar coagular de forma natural. Separar rápidamente el suero del coágulo con el fin de evitar hemólisis. El suero puede conservarse a 2-8°C durante un máximo de 7 días antes del ensayo (ref. 7), o para periodos más largos, distribuir el suero en alícuotas y conservarlo a -20°C, o temperatura inferior. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones. No utilizar muestras de suero contaminado microbiológicamente o con partículas, ni tampoco sueros hemolíticos o lipémicos ya que puede darse un título inferior o patrones de fluorescencia poco claros.

8 METODOLOGÍA

8.1 Material suministrado

Kit FK002.1 para 50 tests

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (10 portas *C. luciliae* de 5 pocillos)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Control positivo para dsDNA, prediluido)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Control negativo para dsDNA, prediluido)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (Conjugado FITC de IgG anti-humano de cordero purificado por afinidad, cadena gamma)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Azul de Evans 1%)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS concentrado 20 veces)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Medio de montaje)
- 20 x *Blotters* (Secantes)
- 10 x *Coverslips* (Cubreobjetos) (22 x 70mm)
- 1 x instrucciones de empleo

Kit FK002.2 para 250 tests

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (25 portas *C. luciliae* de 10 pocillos)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (Control positivo para kits dsDNA, prediluido)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (Control negativo para kits dsDNA, prediluido)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (Conjugado FITC de IgG anti-humano de cordero purificado por afinidad, cadena gamma)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Azul de Evans 1%)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS concentrado 20 veces)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Medio de montaje)
- 50 x *Blotters* (Secantes)
- 25 x *Coverslips* (Cubreobjetos) (22 x 70mm)
- 1 x instrucciones de empleo

9 RESULTADOS

9.1 Control de calidad

El control positivo debe dar un brillo verde manzana en el coloreado del cinetoplasto con o sin coloreado del núcleo. El control negativo deberá dar una coloración verde sin brillo en el organismo sin llegar a percibirse fluorescencia. En caso de no asemejarse los controles a lo antes descrito, el test no es válido y deberá repetirse.

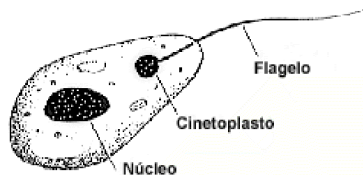
9.2 Interpretación de los resultados

9.2.1 Negativo

Una muestra se considera negativa si la coloración del cinetoplasto específico es igual o menor al control negativo aún cuando brillen otras estructuras tales como el cuerpo basal, el flagelo o el núcleo.

9.2.2 Positivo

Una muestra se considera positiva si la coloración del cinetoplasto es mayor al control negativo. Para diferenciar claramente el cinetoplasto del núcleo se debe ver el pocillo con el control positivo. El cinetoplasto se encuentra siempre más próximo al flagelo (ver ilustración siguiente).



NOTA: Cada laboratorio deberá establecer el punto en que una muestra positiva es considerada clínicamente significativa.

INTERPRETAR LOS RESULTADOS UTILIZANDO SÓLO ORGANISMOS BIEN DEFINIDOS.

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 10.1 La sensibilidad de la prueba está influida por la fuente de luz, filtros así como la óptica de las distintas marcas de microscopios de fluorescencia. El buen funcionamiento del microscopio está significativamente influido por un correcto mantenimiento, centrándose especialmente en la lámpara de mercurio y el cambio de la lámpara después del tiempo recomendado.
- 10.2 Pacientes con LES inducida por fármacos, pueden tener anticuerpos dsDNA (ref. 5).
- 10.3 Pacientes sujetos a terapia con esteroides suelen dar resultados negativos de anticuerpos dsDNA (ref. 6).
- 10.4 No se debe utilizar suero contaminado microbiológicamente ya que pueden dar falsos positivos o negativos.
- 10.5 Si aparece una coloración de fondo inusualmente grande o si hubiera alguna dificultad para interpretar los resultados, el usuario debería aplicar un control de PBS.
- 10.6 Este test es sólo como soporte de un diagnóstico. Un resultado positivo sugiere determinadas enfermedades que deberán ser confirmadas por otras pruebas y/u otros análisis. Los resultados obtenidos con este test no prueban el diagnóstico o la ausencia de la enfermedad.

FDA (USA) Advertencia: ver la primera página de la metódica en inglés.

11 VALORES ESPERADOS

El substrato *Crithidia luciliae* fue utilizado para testar sueros de pacientes con diferentes enfermedades del tejido conjuntivo así como 50 sueros de donantes sanos. A continuación se indican los resultados.

Grupo de pacientes	Cantidad	Coloración positiva de <i>C. luciliae</i>
LES	100	32
Artritis reumatoide	10	0
Esclerodermia	10	0
Síndrome Sjögren	5	0
Normales	50	0

12 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

12.1 Precisión

Se testaron cinco portas del mismo lote con una muestra control conocida diluida hasta el punto final. Los cinco portas dieron al punto final un título de 1/5120, demostrando que no hay diferencias significantes en el funcionamiento entre portas del mismo lote. Se testaron 3 portas de diferentes lotes con una muestra control conocida y con dilución 1/25. Todos los 3 portas dieron una intensidad de fluorescencia semejante (2+).

12.2 Sensibilidad

La sensibilidad de los tests y el límite de identificación están limitados por la calidad del microscopio empleado. No se dispone de un calibrado internacional para una estandarización.

12.3 Especificidad

Se testaron 46 muestras conocidas de niveles altos de anticuerpos a dsDNA y 50 muestras normales con kits *C. luciliae* de The Binding Site y con kits equivalentes de la competencia. La coloración se clasificó positiva (+), fuertemente positiva (2+) y negativa (-):

Kit alternativo	The Binding Site			
	2+	+	-	
	23	8	0	
	+	1	14	0
	-	0	0	50

13 BIBLIOGRAFÍA

1. Aarden, L.A.; de Groot, E. R.; Felkamp, T.E.W. (1975): Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae*, a sample substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sci. 254: 505-515.
2. 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.
3. Sontheimer, R.D.; Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab. Clin. Med. 91: 550-558.
4. Weller, T.H.; Coons, A.H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in Vitro: Proc. Soc. Agent. Biol. Med. 86: 789-794.
5. Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J. Rheum. 2: 215-220.
6. Ballou, S.P.; Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
7. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A Milford Ward, J Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

14 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

- 14.1 Dejar que el medio de montaje alcance la temperatura ambiente.
- 14.2 Diluir el tampón PBS con agua destilada.
- 14.3 Diluir 1/10 las muestras de suero con PBS.
- 14.4 Extraer los portas del refrigerador y dejar que alcancen la temperatura ambiente (18-28°C).
- 14.5 Sacar los portas del embalaje y colocarlos en la cámara húmeda. Aplicar 25µL de cada control y de suero.
- 14.6 Incubar a temperatura ambiente (18-28°C) durante 30 minutos.
- 14.7 Lavar los portas con PBS: primero con el frasco lavador y después sumergiendo los portas en la bandeja de tinción durante 10 minutos.
- 14.8 Sacar los portas de la bandeja de tinción, secar alrededor de los pocillos y volver a colocar en la cámara húmeda, aplicando inmediatamente una gota del conjugado de fluorescencia.
- 14.9 Incubar otros 30 minutos.
- 14.10 Lavar otra vez según descripción en el punto 14.7.
- 14.11 Extraer los portas, secar bien alrededor de los pocillos, poner medio de montaje sobre cada pocillo y cubrir con los cubreobjetos.
- 14.12 Evaluar los portas bajo el microscopio de fluorescencia.

1	Utilização
2	Resumo e explicação
3	Princípio da técnica
4	Reagentes
5	Precauções
6	Armazenamento e estabilidade
7	Colheita das amostras
8	Metodologia
9	Resultados
10	Limitações da técnica
11	Valores de referência
12	Características específicas
13	Referências
13	Resumo da técnica

KIT/LÂMINAS COM SUBSTRATO DE CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA

Portuguese

Para diagnóstico *in-vitro*

Código do Produto: **FK002._**
FS002._

Produto fabricado por:

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

Telefone: +44 (0) 121 436 1000

Fax: +44 (0) 121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk



1 UTILIZAÇÃO

Este produto (kit ou lâminas com substrato) é indicado para o despiste e quantificação dos auto-anticorpos anti-dsDNA. Este autoanticorpo é um marcador para o diagnóstico e monitorização do lupus eritematoso sistémico (LES). As lâminas vendidas separadamente, não foram testadas com outros sistemas de detecção, no entanto a sua utilização não deverá ser excluída.

2 RESUMO E EXPLICAÇÃO

O ácido desoxirribonucleico é encontrado naturalmente em pelo menos três formas distintas: sob a forma de cadeia dupla direita (dsDNA); cadeia dupla esquerda (Z-DNA) e cadeia simples (ssDNA). Todas estas formas contêm determinantes contra os quais podem ser produzidos autoanticorpos. Os autoanticorpos anti-dsDNA e anti-ssDNA são frequentemente encontrados associados a doenças autoimunes.

Os anticorpos anti-ssDNA (para as bases nucleotídicas da molécula de DNA) não são específicos de uma doença, podendo ser encontrados em doentes com artrite reumatóide, LES, esclerose sistémica e outras doenças não imunológicas. São os principais constituintes da maioria dos anticorpos anti-nucleares (ANA), apresentando-se sob a forma de um padrão homogéneo nos testes por imunofluorescência indirecta.

Os anticorpos anti-dsDNA são produzidos contra o esqueleto de desoxirribose fosfato da molécula de DNA. São menos comuns que os anticorpos anti-ssDNA, mas com um maior significado clínico devido essencialmente a duas razões principais. Em primeiro lugar, altos títulos de anti-dsDNA são encontrados em doentes com LES e em segundo lugar, porque títulos destes anticorpos encontram-se correlacionados com a actividade da doença. Este marcador providencia assim informações importantes no que diz respeito quer à progressão, quer à severidade da doença e o grau de resposta a um tratamento subsequente.

Alguns métodos foram utilizados ao longo dos anos para detectar anticorpos anti-dsDNA, tais como aglutinação passiva, fixação do complemento e RIA. O flagelado, C. luciliae, utilizado como substrato nos ensaios por imunofluorescência indirecta, é um teste de pesquisa sensível e específico. C. luciliae possui um organelo denominado de cinetoplasto; uma mitocôndria gigante contendo dsDNA (ref. 1) mas aparentemente livre de histonas e outros antígenos nucleares de mamífero. A vantagem da utilização da C. luciliae como despiste para os anticorpos anti-dsDNA é a sua especificidade, devido à presença do cinetoplasto (refs 2 & 3).

3 PRINCÍPIO DA TÉCNICA

É utilizada uma técnica por imunofluorescência indirecta, com este kit (ref. 4), onde quer as amostras dos doentes, quer os controlos apropriados são incubados com substrato C. luciliae. Os anticorpos que não reagem são eliminados por lavagem, sendo depois aplicado um conjugado marcado com fluoresceína. O conjugado excedente é depois removido também por lavagem. As lâminas são observadas ao microscópio de fluorescência, onde as amostras anti-dsDNA positivas revelam uma fluorescência "verde-maçã" do cinetoplasto.

4 REAGENTES

4.1 Substrato C. luciliae em lâminas de 5 e 10 poços.

Somente os kits:

4.2 Soro controlo positivo revelando coloração do cinetoplasto, contendo azida a 0,099%. Pré-diluído e pronto a utilizar.

4.3 Soro controlo negativo, contendo azida de sódio 0,099%. Pré-diluído e pronto a utilizar.

- 4.4 Anti-IgG (cadeia gama) humana purificada e marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), contendo azida de sódio 0,099%. Pré-diluído e pronto a utilizar.
- 4.5 Azul de Evans a 1%, como contrastante opcional.
- 4.6 Tampão fosfato (PBS), 20x concentrado na forma líquida.
- 4.7 Discos adsorventes (blotters) para absorver o excesso de tampão após a lavagem.
- 4.8 Meio de montagem, contendo um agente que evita a perda de fluorescência (DABCO, 1, 4, diazabicyclo [2.2.2] octano).
- 4.9 Lamelas.

5 PRECAUÇÕES

Todos os dados de soro fornecido nos kits foram examinados e determinados negativos para o antígeno da superfície do vírus Hepatite B, anticorpos contra o vírus da Hepatite C e para o Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV 1 & 2). No entanto estes testes não garantem a ausência de agentes infecciosos. Deverão ser estabelecidas medidas adequadas para o manuseamento e eliminação de material potencialmente infectado e o procedimento deverá ser efectuado apenas por pessoal treinado nestes métodos.

Este produto deve ser apenas utilizado por pessoal treinado e para o objectivo indicado. Recomenda-se que seja seguido o procedimento.

Alguns componentes do kit contêm azida de sódio a 0,099% como conservante e devem ser manuseados com cuidado – não ingerir nem permitir o contacto com a pele ou membranas mucosas. Em caso de contacto lavar abundantemente com água e procurar um médico. Podem formar-se azidas metálicas explosivas nas canalizações de cobre e alumínio; quando eliminar o reagente lavar abundantemente com água para impedir a formação das azidas.

6 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Os kits/lâminas fechados devem ser guardados a 2-8°C e podem ser utilizados até à data de validade inscrita. NÃO CONGELAR. Quando se retirar as lâminas do invólucro, estas deverão ser utilizadas imediatamente. O PBS diluído pode ser guardado até um mês a 2-8°C. O conjugado com fluoresceína deve ser mantido longe de luz solar, fluorescente ou U.V. sempre que possível. Todos os reagentes devem ser guardados a 2-8°C.

7 COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue devem ser colhidas por punção venosa, deixar coagular naturalmente e separar o soro o mais rápido possível para prevenir a hemólise. O soro pode ser conservado de 2-8°C até 7 dias antes do teste (ref. 7), ou em aliquotas a -20°C ou menos, para períodos mais prolongados. Não congelar e descongelar o soro mais do que uma vez. Evitar a utilização de soros lipémicos, hemolisados e contaminados com microorganismos dado que poderá ocorrer uma diminuição do título ou um padrão de marcação pouco claro.

8 METODOLOGIA

8.1 Material fornecido

Kit para 50 testes FK002.1

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (lâminas com *C. lucilliae*, 5 poços)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Controlo positivo para dsDNA, pré-diluído)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Controlo negativo para dsDNA, pré-diluído)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (Conjugado anti-IgG (cadeia gama) humano purificado e marcado com FITC)
- 1 x 3mL 1% *Evans Blue Counterstain* (Contrastante Azul de Evans a 1%)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS concentrado, x20)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
- 20 x *Blotters* (Discos adsorventes)
- 10 x *Coverslips* (Lamelas, 22 x 70mm)
- 1 x folheto de instruções

Kit para 250 testes FK002.2

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (lâminas com *C. lucilliae*, 10 poços)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Controlo positivo para dsDNA, pré-diluído)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Controlo negativo para dsDNA, pré-diluído)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (Conjugado anti-IgG (cadeia gama) humano purificado e marcado com FITC)
- 1 x 3mL 1% *Evans Blue Counterstain* (Contrastante Azul de Evans a 1%)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS concentrado, x20)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
- 50 x *Blotters* (Discos adsorventes)
- 25 x *Coverslips* (Lamelas, 22 x 70mm)
- 1 x folheto de instruções

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- 10 lâminas x 5 poços, 25 lâminas x 10 poços, 100 lâminas x 10 poços, respectivamente
- 1 x folheto de instruções

8.2 Material adicional necessário

- 8.2.1 Água destilada para diluir o PBS concentrado.
- 8.2.2 Recipiente para o tampão PBS.
- 8.2.3 Micropipetas e pontas descartáveis para aplicação das amostras dos doentes.
- 8.2.4 Câmara húmida para os passos de incubação (ex. Câmara de Coloração Magnética, Código BD010).
- 8.2.5 Microscópio de fluorescência com filtro excitador de 495nm e um filtro barreira de 515nm.
- 8.2.6 No caso de utilização apenas das lâminas, poderá adquirir o seguinte material à The Binding Site: controlo positivo (FA109), controlo negativo (CON 92), conjugado anti-IgG (cadeia gama) humano marcado com FITC (FA004, pré-diluído e pronto a usar, ou AF004, diluir 1/100-1/400 para utilizar), PBS (CON 3.3), Azul de Evans (CON 93, opcional), meio de montagem (CON 195.1/2), discos adsorventes, lamelas.

8.3 Procedimento

Controlo de qualidade

Os controlos positivos e negativos devem ser utilizados sempre que são testadas as amostras. É recomendado a utilização, em cada ensaio de um controlo titulado.

- 8.3.1 Meio de montagem: Retirar o meio de montagem do frigorífico para que este atinja a temperatura ambiente (18-28°C) antes de ser utilizado.

- 8.3.2 Diluir o PBS concentrado. Diluir o PBS concentrado em água destilada (1 parte de PBS concentrado + 19 partes de água destilada) e misturar bem. Nota: o PBS é utilizado para diluir as amostras dos doentes e como tampão de lavagem. Diluir todo o PBS apenas se o kit for todo utilizado dentro de um mês.

- 8.3.3 Diluição das amostras. **Despiste**: Diluir as amostras 1/10 adicionando 50µL de soro a 450µL de tampão PBS.

Quantificação: Efectuar diluições sucessivas das amostras positivas com o tampão PBS (ex: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 etc.). Por exemplo: Uma amostra de 100µL com uma diluição de 1/10 misturar com 100µL de PBS para obter uma diluição de 1/20. Repetir este procedimento para as diluições seguintes.

- 8.3.4 Lâminas com substrato. Deixar as lâminas com substrato atingirem a temperatura ambiente (18-28°C) antes de se retirarem do invólucro. Rotular as amostras correctamente, colocar na câmara húmida e adicionar uma gota do controlo positivo e do controlo negativo nos poços 1 e 2 respectivamente. Adicionar 25µL de amostra previamente diluída nos restantes poços.

- 8.3.5 Incubação das lâminas. Incubar as lâminas durante 30 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente (18-28°C).

- 8.3.6 Lavagem com PBS. Remover as lâminas da câmara húmida e lavar abundantemente com o esguicho de PBS, mas com cuidado. Não deitar directamente nos poços. Colocar as lâminas num suporte e imergi-las em PBS e agitar durante 10 minutos.

- 8.3.7 Adição do conjugado fluorescente. Sacudir o excesso de PBS e absorve-lo em volta dos poços utilizando os discos adsorventes ou outro tipo de papel. Colocar novamente as lâminas na câmara húmida e colocar imediatamente uma gota de conjugado fluorescente em cada poço. NÃO DEIXAR OS POÇOS SECOS POR MAIS DE 15 SEGUNDOS. SE O SUBSTRATO SECAR OS RESULTADOS SERÃO SERIAMENTE AFECTADOS.

- 8.3.8 Incubação da lâmina. Incubar as lâminas durante 30 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente (18-28°C) no escuro.

- 8.3.9 Lavagem com PBS. Lavar novamente como descrito no passo 6. Contrastante opcional: Adicionar 2-3 gotas de Azul de Evans a 1% por 100mL de PBS antes da imergir a lâmina.

- 8.3.10 Montagem com a lamela. Remover uma lâmina de cada vez da solução de PBS. Secar rapidamente em volta dos poços e adicionar uma gota de meio de montagem a cada poço. Colocar cuidadosamente a lamela na lâmina, evitando a formação de bolhas de ar; no entanto se existirem não tentar removê-las. Cuidadosamente, limpar algum excesso de meio de montagem.

- 8.3.11 Observação das lâminas num microscópio de fluorescência. As lâminas podem ser guardadas a 2-8°C na escuridão durante alguns dias sem perda significativa da fluorescência.

9 RESULTADOS

9.1 Controlo de qualidade

O controlo positivo deverá dar uma coloração específica verde-maçã do cinetoplasto com ou sem coloração do núcleo. O controlo negativo deverá apresentar uma coloração verde tênue do organismo, não evidenciando uma fluorescência específica. Se os controlos não se revelarem como o descrito, o teste deve ser considerado inválido e deverá ser repetido.

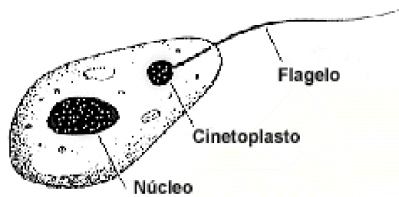
9.2 Interpretação dos resultados

9.2.1 Negativo

Uma amostra é considerada negativa se a coloração específica do cinetoplasto é equivalente ao do poço correspondente ao controlo negativo, mesmo se outras estruturas, tais como o corpo basal, flagelo e núcleo se encontrem corados.

9.2.2 Positivo

Uma amostra é considerada positiva se a coloração do cinetoplasto é superior à coloração evidenciada pelo poço do controlo negativo. Para diferenciar o cinetoplasto do núcleo, ver poço do controlo positivo. O cinetoplasto encontra-se sempre localizado perto do flagelo (ver figura abaixo).



NOTA: Cada laboratório deve estabelecer qual o ponto pelo qual um resultado positivo é considerado como tendo significado clínico.

INTERPRETAR RESULTADOS UTILIZANDO APENAS UM ÚNICO ORGANISMO BEM DEFINIDO.

10 LIMITAÇÕES DA TÉCNICA

- 10.1 A fonte de luz, os filtros e as oculares de microscópios de fluorescência diferentes irão influenciar a sensibilidade do teste. A qualidade do microscópio é significativamente influenciado pela manutenção correcta, especialmente o cimbre da lâmpada de vapor de mercúrio e substituição da lâmpada após o período de tempo recomendado.
- 10.2 Poderão existir anticorpos anti-dsDNA em doentes com LES induzidos com drogas (ref. 5).
- 10.3 Doentes submetidos a terapias com esteróides poderão dar resultados negativos para anticorpos anti-dsDNA (ref. 6).
- 10.4 Não deve ser utilizado soro contaminado com microorganismos, isto porque poderão ocorrer resultados falsos positivos ou negativos.
- 10.5 Se se denotar interferências anormais na coloração, ou se houver uma dificuldade de interpretação dos resultados, deve-se utilizar um controlo PBS.
- 10.6 Este teste é utilizado como ajuda no diagnóstico. Resultados positivos sugerem certas doenças, mas que devem ser confirmadas por sinais clínicos e outros testes serológicos. Os resultados obtidos com este teste não são uma prova de diagnóstico da presença ou ausência de doença.

Informação da FDA (EUA) - ver folha de rosto do Folheto de Instruções em Inglês.

11 VALORES DE REFERÊNCIA

O substrato *C. luciliae* foi utilizado para testar uma variedade de doentes com doenças do tecido conjuntivo e 50 dadores de sangue normais. Os resultados encontram-se disponíveis na tabela abaixo:

Grupo de pacientes	Número	Coloração <i>C. luciliae</i> positiva
LES	100	32
Artrite Reumatóide	10	0
Escleroderma	10	0
Síndrome de Sjögren	5	0
Normais	50	0

12 CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

12.1 Precisão

Cinco lâminas do mesmo lote foram testadas com uma amostra controlo com um resultado conhecido, a qual foi diluída fora do end-point. Todas estas 5 lâminas deram um end-point com um título de 1/5120, demonstrando que não existe diferença significativa na performance entre as lâminas pertencentes ao mesmo lote. Três lâminas de lotes diferentes foram testadas com uma amostra controlo conhecida tendo sido diluída 1/25. Todas estas três lâminas deram uma intensidade equivalente de coloração (2+).

12.2 Sensibilidade

A sensibilidade do teste e o limite de detecção dependem do microscópio utilizado. Não existe nenhum calibrador internacional standard disponível.

12.3 Especificidade

46 soros conhecidos como contendo altos níveis de anticorpos anti-dsDNA e 50 soros normais foram testados com o kit *C. luciliae* da The Binding Site kit e com um kit comercial equivalente por IFA da concorrência. A coloração foi classificada como positiva (+), fortemente positiva (2+) e negativa (-):

Kit comparativo		The Binding Site		
		2+	+	-
	2+	23	8	0
	+	1	14	0
	-	0	0	50

13 REFERENCIAS

1. Aarden, L.A.; de Groot, E. R.; Felkamp, T.E.W. (1975): Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae*, a sample substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sci. 254: 505-515.
2. 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.
3. Sontheimer, R.D.; Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab. Clin. Med. 91: 550-558.
4. Weller, T.H.; Coons, A.H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in Vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789-794.
5. Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J. Rheum. 2: 215-220.
6. Ballou, S.P.; Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
7. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A Milford Ward.J.Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

14 RESUMO DA TÉCNICA

- 14.1 Equilibrar o meio de montagem à temperatura ambiente.
- 14.2 Diluir o PBS com água destilada.
- 14.3 Diluir as amostras 1/10 com PBS.
- 14.4 Retirar as lâminas do frio e equilibrar à temperatura ambiente (18-28°C).
- 14.5 Retirar a lâmina do invólucro e colocar na câmara húmida. Adicionar 25µL dos controlos e amostras.
- 14.6 Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-28°C).
- 14.7 Enxaguar as lâminas com o esguicho de PBS. Lavar durante 10 minutos no suporte.
- 14.8 Absorver o excesso em volta do poço, e adicionar imediatamente uma gota de conjugado fluorescente.
- 14.9 Incubar as lâminas durante 30 minutos.
- 14.10 Lavar novamente como descrito no paço 7.
- 14.11 Absorver em volta dos poços, adicionar o meio de montagem a cada poço e a lamela.
- 14.12 Observar as lâminas num microscópio de fluorescência.

1	Indicazioni
2	Riassunto e descrizione
3	Principio
4	Reagenti
5	Precauzioni
6	Conservazione e stabilità
7	Prelievo campioni
8	Metodologia
9	Risultati
10	Limiti della procedura
11	Valori attesi
12	Prestazioni
13	Bibliografia
14	Sintesi della procedura

KITS/VETRINI CRITHIDIA LUCILIAE (DNA Doppio Filamento)

Italian

Per uso diagnostico *in vitro*

**Codice Prodotto: FK002._
FS002._**

Prodotto da:

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

Telefono: +44 (0) 121 436 1000

Fax: +44 (0) 121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk



1 INDICAZIONI

Questo prodotto (kit o substrato) è indicato per essere utilizzato per lo screening e la titolazione di autoanticorpi diretti contro il DNA a doppio filamento (dsDNA). Questo autoanticorpo è un marker per la diagnosi e il monitoraggio del lupus eritematoso sistemico (LES). Per i vetrini venduti a parte, non è stata valutata l'idoneità all'uso con altri sistemi d'identificazione ma non dovrebbe esserne escluso necessariamente l'uso in questi test.

2 RIASSUNTO E DESCRIZIONE

L'acido deossiribonucleico esiste naturalmente in almeno tre forme diverse: una conformazione a doppio filamento a destra (dsDNA); una conformazione a doppio filamento a sinistra (Z-DNA) e una conformazione monofilamento (ssDNA). Tutte le forme contengono dei determinanti contro i quali è possibile produrre degli anticorpi. Gli autoanticorpi del dsDNA e del ssDNA si riscontrano abitualmente nei pazienti con malattie autoimmuni.

Gli anticorpi del ssDNA (delle basi nucleotidiche della molecola del DNA) non sono specifici per una particolare patologia e si possono riscontrare nei pazienti affetti da artrite reumatoide, LES, sclerosi sistemica e altre malattie non immunologiche. Sono uno dei costituenti principali della maggior parte degli anticorpi antinucleari (ANA) con un aspetto omogeneo nelle analisi di immunofluorescenza indiretta.

Gli anticorpi del dsDNA sono diretti contro il deossiribosio fosfato, asse della molecola del DNA. Sono meno comuni rispetto agli anticorpi del ssDNA, ma sono più significativi dal punto di vista clinico per due motivi principali. Innanzitutto, titoli elevati di anti-DNA a doppio filamento si riscontrano solo raramente nei pazienti affetti da LES e in secondo luogo i titoli anticorpali sono correlati con l'attività patologica. Ciò fornisce un marker importante per la progressione e la gravità della malattia e il grado di risposta a qualsiasi trattamento successivo.

Diversi metodi sono stati utilizzati nel corso degli anni per identificare gli anticorpi anti-dsDNA, quali l'agglutinazione passiva, la fissazione del complemento e la RIA. L'emoflagellato C. luciliae usato come substrato nelle analisi a immunofluorescenza indiretta, è un test di screening sensibile e specifico. Il C. luciliae possiede un organello chiamato cinetoplasto; un mitocondrio gigante contenente dsDNA (rif. 1) ma apparentemente senza istoni e altri antigeni nucleari di mammiferi. Il vantaggio del C. luciliae per lo screening degli anticorpi anti-dsDNA è rappresentato dalla sua specificità, legata alla composizione del cinetoplasto (rif. 2 e 3).

3 PRINCIPIO

Il test usa una tecnica di immunofluorescenza indiretta (rif. 4). I campioni dei pazienti e i controlli adeguati sono incubati con il substrato di C. luciliae. Gli anticorpi non specifici sono eliminati con il lavaggio, quindi viene applicato un coniugato fluorescente appropriato. Il coniugato non legato viene eliminato come prima con il lavaggio. Per la lettura dei vetrini si usa un microscopio a fluorescenza. I campioni dsDNA positivi producono una fluorescenza di colore verde del cinetoplasto.

4 REAGENTI

4.1 Vetrini (5 o 10 pozzetti) preparati con C. luciliae.

I kit contengono:

4.2 Siero controllo positivo dà una colorazione del cinetoplasto. E' fornito prediluito, pronto all'uso e contiene lo 0,099% di sodio azide.

4.3 Siero controllo negativo, contenente lo 0,099% di sodio azide. E' fornito prediluito, pronto all'uso.

- 4.4 Antisiero di pecora anti-IgG umane (catena gamma) purificato per affinità e coniugato con isofiocianato di fluoresceina (FITC). Contiene lo 0,099% di sodio azide. È fornito prediluito, pronto all'uso.
- 4.5 Soluzione Blu di Evans all'1%, facoltativo.
- 4.6 Soluzione liquida di PBS, concentrata (x20)
- 4.7 Carte assorbenti per asciugare intorno ai pozzetti.
- 4.8 Mezzo di montaggio, contenente un agente "anti-afievolimento" (DABCO, 1, 4, diazabicio [2.2.2] ottano).
- 4.9 Vetrini coprioggetti.

5 PRECAUZIONI

Il siero di tutti i donatori umani fornito (solo kit) è stato testato ed è risultato negativo all'antigene dell'Epatite B, agli anticorpi del virus dell'Epatite C e del HIV 1 e 2. Ciò nonostante, questi test non possono garantire l'assenza di agenti infettivi. Devono essere stabiliti metodi di trattamento e di eliminazione adeguati come per tutti i materiali potenzialmente infettivi e le procedure devono essere eseguite soltanto dal personale esperto.

Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale adeguatamente formato. Si raccomanda di attenersi rigorosamente alla procedura indicata.

Alcuni dei componenti del kit contengono lo 0,099% di sodio azide come conservante e bisogna seguire certe precauzioni – non ingerire né permettere il contatto con la pelle o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare con molta acqua e rivolgersi al medico. Azotidri metallici esplosivi si possono formare con il rame e il piombo. Lavare con molta acqua i recipienti che hanno contenuto questi reagenti allo scopo di evitare la formazione di azotidri.

6 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I kit o i vetrini non aperti devono essere conservati a 2-8°C e possono essere usati fino alla data di scadenza indicata. NON CONGELARE. Una volta estratti dal loro involucro, i vetrini devono essere usati immediatamente. Il tampone PBS diluito può essere conservato fino ad un mese a 2-8°C. Il coniugato FITC del kit deve essere tenuto lontano dalla luce naturale, fluorescente e UV il più possibile. Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C.

7 PRELIEVO CAMPIONI

Usare campioni di siero. Lasciare che il sangue si coaguli in modo naturale per separare il siero il più rapidamente possibile onde evitare l'emolisi. Il siero può essere conservato a 2-8°C per un massimo di 7 giorni prima del dosaggio (rif. 7), oppure per periodi più lunghi, aliquotare e conservare a -20°C o temperature inferiori. NON congelare e scongelare più di una volta. Evitare l'uso di sieri lipemici, emolizzati o contaminati da microbi in quanto si potrebbero avere titoli più bassi o aspetti di colorazione non chiari.

8 METODOLOGIA

8.1 Materiali forniti

Kit per 50 test FK002.1

- 10 *Crithidia Slide* – 5-well (Vetrini x 5 pozzetti con *C. luciliae*)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Controllo positivo per DNA doppio filamento, prediluito, pronto all'uso)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Controllo negativo per DNA doppio filamento, prediluito, pronto all'uso)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (Coniugato FITC anti-IgG umane (catena gamma), purificato per affinità)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Blu di Evans all'1%)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS concentrato, x 20)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Mezzo di montaggio)
- 20 x *Blotters* (Carte assorbenti)
- 10 x *Coverslips* (Vetrini coprioggetti, 22 x 70mm)
- 1 scheda tecnica

Kit per 250 test FK002.2

- 25 *Crithidia Slide* – 10-well (Vetrini x 10 pozzetti con *C. luciliae*)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Controllo positivo per DNA doppio filamento, prediluito, pronto all'uso)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Controllo negativo per DNA doppio filamento, prediluito, pronto all'uso)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (Coniugato FITC anti-IgG umane (catena gamma), purificato per affinità)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Blu di Evans all'1%)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS concentrato, x20)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Mezzo di montaggio)
- 50 x *Blotters* (Carte assorbenti)
- 25 x *Coverslips* (Vetrini coprioggetti, 22 x 70mm)
- 1 scheda tecnica

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- Rispettivamente 10 vetrini x 5 pozzetti, 25 vetrini x 10 pozzetti, 100 vetrini x 10 pozzetti
- 1 scheda tecnica

8.2 Materiale necessario ma non fornito

- 8.2.1 Acqua distillata per diluire il concentrato di PBS.
- 8.2.2 Recipiente per contenere il PBS diluito e bottiglia in plastica a pressione per il lavaggio iniziale con PBS.
- 8.2.3 Micropipette e puntali monouso per applicare i campioni dei pazienti.
- 8.2.4 Camera umida per le fasi d'incubazione (p.e. Camera di Colorazione Magnetica, Codice BD010).
- 8.2.5 Microscopio a fluorescenza con filtro 495nm e filtro 515nm.
- 8.2.6 Se sono forniti solo i vetrini, è necessario procurarsi (codici Binding Site forniti ove applicabile): il controllo positivo (FA109), il controllo negativo (CON 92), il coniugato FITC (FA004, prediluito pronto all'uso, o AF004, diluire 1/100 – 1/400 per l'uso), PBS (CON 3.3), Blu di Evans (CON 93 optional), mezzo di montaggio (CON 195.1/2), carte assorbenti, vetrini coprioggetti.

8.3 Procedura

Controllo qualità

I controlli negativi e positivi devono essere usati ogni volta che sono testati i campioni. Si raccomanda inoltre di utilizzare un controllo titolato per ogni test.

- 8.3.1 Mezzo di montaggio: Togliere il mezzo di montaggio dal frigorifero per portarlo a temperatura ambiente (18-28°C) con anticipo.
- 8.3.2 Diluire il PBS concentrato. Diluire il PBS con acqua distillata (1 parte di PBS + 19 parti di acqua distillata) e miscelare. Il PBS si usa per diluire i campioni dei pazienti e come tampone di lavaggio. NB: Preparare tutto il PBS soltanto se l'intero kit deve essere utilizzato in un mese.
- 8.3.3 Diluire i campioni dei pazienti.
Screening: Diluire i campioni 1/10 aggiungendo 50µL di siero in 450µL di PBS.
Titolazione: Fare una serie di diluizioni del siero nel PBS (es. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 ecc.).
Per esempio: Prendere 100µL della diluizione del campione 1/10, diluire con 100µL di PBS per ottenere una diluizione 1/20. Ripetere questa procedura per ulteriori diluizioni.

- 8.3.4 Vetrini con substrato. I vetrini devono raggiungere la temperatura ambiente (18-28°C) prima di essere tolti dalla confezione. Etichettare correttamente i vetrini, metterli nella camera umida e aggiungere una goccia del controllo positivo e del controllo negativo rispettivamente nei pozzetti 1 e 2. Aggiungere 25µL di campioni diluiti nei pozzetti rimanenti.

- 8.3.5 Incubazione vetrini. Incubare i vetrini per 30 minuti in una camera umida a temperatura ambiente (18-28°C).

- 8.3.6 Lavaggio PBS. Togliere i vetrini dalla camera umida e risciacquarli con cura con il PBS in una bottiglia di plastica a pressione. Non spruzzare direttamente nei pozzetti. Posizionare i vetrini in un rack e immergerli nel PBS, poi agitare per 10 minuti.

- 8.3.7 Aggiunta di coniugato fluorescente. Eliminare l'eccesso di PBS e asciugare intorno ai pozzetti con le carte assorbenti fornite. Riportare i vetrini nella camera umida e coprire ogni pozzetto con una goccia di coniugato fluorescente. NON LASCIARE I POZZETTI SCOPERTI PER OLTRE 15 SECONDI. L'essiccazione del substrato compromette seriamente i risultati.

- 8.3.8 Incubazione vetrini. Incubare i vetrini per 30 minuti in una camera umida a temperatura ambiente (18-28°C) al buio.

- 8.3.9 Lavaggio PBS. Lavare nuovamente come descritto nella fase 6. Colorazione di contrasto opzionale: Aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al 1% per 100mL di PBS prima di immergere i vetrini.

- 8.3.10 Montaggio con il vetrino coprioggetti. Rimuovere un vetrino alla volta dal lavaggio PBS. Asciugare rapidamente intorno ai pozzetti e aggiungere una goccia di mezzo di montaggio in ciascun pozzetto. Mettere il vetrino coprioggetti sul vetrino, evitando la formazione di bolle d'aria, ma se ci sono non tentare di rimuoverle. Rimuovere con cura l'eventuale mezzo di montaggio in eccesso.

- 8.3.11 Lettura dei vetrini con il microscopio a fluorescenza. I vetrini finiti devono essere letti il più presto possibile ma possono essere conservati a 2-8°C nell'oscurità fino a 1 settimana, senza una grossa perdita di fluorescenza.

9 RISULTATI

9.1 Controllo qualità

Il controllo positivo deve dare una colorazione verde mela del cinetoplasto con o senza colorazione del nucleo. Il controllo negativo deve avere una colorazione verde scuro, senza fluorescenza visibile. Se i controlli non risultano come sopra descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

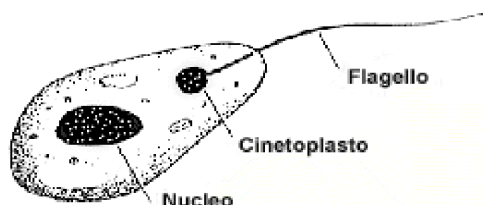
9.2 Interpretazione dei risultati

9.2.1 Negativo

Un campione è considerato negativo se la colorazione specifica del cinetoplasto è equivalente o inferiore a quella del pozzetto del controllo negativo, anche se si colorano altre strutture quali il corpo basale, il flagello o il nucleo.

9.2.2 Positivo

Un campione è considerato positivo se la colorazione specifica del cinetoplasto è superiore a quella del controllo negativo. Per differenziare chiaramente il cinetoplasto dal nucleo, osservare il pozzetto del controllo positivo. Il cinetoplasto si troverà sempre più vicino al flagello (vedere l'illustrazione qui di seguito).



NB: Ogni laboratorio deve stabilire a che punto un risultato positivo è considerato clinicamente significativo.

INTERPRETARE I RISULTATI USANDO SOLTANTO ORGANISMI SINGOLI, BEN DEFINITI.

10 LIMITI DELLA PROCEDURA

- 10.1 La fonte luminosa, i filtri e l'ottica dei microscopi a fluorescenza di diverse marche influiranno sulla sensibilità del test. La performance del microscopio è influenzata notevolmente da una corretta manutenzione, e in particolare dalla centratura e dalla sostituzione della lampada ai vapori metallici dopo il periodo di tempo consigliato.
- 10.2 I pazienti con LES indotto da farmaco possono risultare positivi (rif. 5).
- 10.3 Al contrario, i pazienti sottoposti a terapia steroidea possono risultare negativi (rif. 6).
- 10.4 Non bisogna usare siero contaminato da batteri, poiché si possono avere falsi-positivi o falsi-negativi.
- 10.5 Se appare un'evidente dicolorazione di sfondo o se si hanno difficoltà nell'interpretazione dei risultati, si può ricorrere a un controllo PBS.
- 10.6 Questo kit costituisce soltanto un aiuto alla formulazione della diagnosi. Un risultato positivo suggerisce la presenza di certe patologie che devono essere confermate da controlli clinici e altri test sierologici. I risultati ottenuti da questo test non costituiscono una prova diagnostica della presenza o dell'assenza di patologie.

FDA (USA) Avvertenze: vedere la pagina iniziale delle istruzioni per l'uso in Inglese.

11 VALORI ATTESI

Il substrato *Crithidia luciliae* è stato utilizzato per testare vari pazienti affetti da malattie del tessuto connettivo e anche 50 donatori sani. I risultati sono riportati nella tabella qui di seguito:

Gruppo di pazienti	Numero	Colorazione positiva per <i>C. luciliae</i>
LES	100	32
Artrite Reumatoide	10	0
Scleroderma	10	0
Sindrome di Sjögren	5	0
Pazienti sani	50	0

12 PRESTAZIONI

12.1 Precisione

Sono stati testati cinque vetrini dello stesso lotto con un campione di controllo noto che è stato diluito fino all'end-point. Tutti i cinque vetrini hanno dato un titolo di end-point di 1/5120. Ciò dimostra che non esiste una differenza significativa nelle prestazioni tra i vetrini dello stesso lotto. Sono stati testati tre vetrini di lotti diversi con un campione di controllo noto che è stato diluito in un rapporto 1/25. Tutti i tre vetrini hanno dato un'intensità di colorazione equivalente (2+).

12.2 Sensibilità

La sensibilità dei test e il limite d'identificazione dipendono dal microscopio utilizzato. Non esiste nessun dispositivo di calibrazione internazionale per standardizzare questi parametri.

12.3 Specificità

Sono stati testati 46 sieri contenenti livelli elevati di anticorpi di DNA doppio filamento e 50 sieri normali nel kit *C. luciliae* di The Binding Site e nei kit IFA equivalenti disponibili in commercio. La colorazione è stata classificata positiva (+), molto positiva (2+) e negativa (-):

Kit di confronto	The Binding Site			
	2+	+	-	
	23	8	0	
	+	14	0	
	-	0	0	50

13 BIBLIOGRAFIA

1. Aarden, L.A.; de Groot, E. R.; Felkamp, T.E.W. (1975): Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae*, a sample substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. Ann. NY Acad. Sci. 254: 505-515.
2. 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.
3. Sontheimer, R.D.; Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab. Clin. Med. 91: 550-558.
4. Weller, T.H.; Coons, A.H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in Vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789-794.
5. Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J. Rheum. 2: 215-220.
6. Ballou, S.P.; Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
7. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A Milford Ward, J Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

14 SINTESI DELLA PROCEDURA

- 14.1 Portare il mezzo di montaggio a temperatura ambiente.
- 14.2 Diluire PBS con acqua distillata.
- 14.3 Diluire i sieri 1/10 con PBS.
- 14.4 Togliere i vetrini dal frigorifero e portarli a temperatura ambiente (18-28°C).
- 14.5 Togliere il vetrino dalla confezione e metterlo in una camera umida. Aggiungere 25µL di controlli e di sieri dei pazienti.
- 14.6 Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (18-28°C).
- 14.7 Risciacquare i vetrini con un getto di PBS e lavarli per 10 minuti in un rack.
- 14.8 Asciugare intorno a ciascun pozzetto, riportare il vetrino nella camera umida e aggiungere immediatamente una goccia di coniugato fluorescente.
- 14.9 Incubare i vetrini per 30 minuti.
- 14.10 Lavare ancora come descritto nella fase 7.
- 14.11 Asciugare intorno ai pozzetti, aggiungere i mezzi di montaggio in ciascun pozzetto e il vetrino coprioggetti.
- 14.12 Leggere i vetrini con il microscopio a fluorescenza.