

CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA KITS/SUBSTRAT SLIDES

Norwegian

Til *in-vitro* diagnostisk bruk

Produktkode: **FK002._**
FS002._

Produktet produsert av:

The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, U.K.

www.bindingsite.co.uk

Telefon : +44 (0)121 436 1000

Fax : +44 (0)121 430 7061

e-mail: info@bindingsite.co.uk

Selges i Norge gjennom:

SmithMED, Granveien 29, 1430 Ås

Tel.:6680 6690 Faks.: 6494 0004

e-post: post@smithmed.com



1 ANVENDELSE

Dette produktet (kit eller substrat slides) er tenkt brukt til screening og titrering av sirkulerende anti double stranded DNA (dsDNA) autoantistoff. Dette autoantistoff er en markør for diagnosen og monitorering av systemisk lupus erythematosus (SLE). For slides solgt separat har deres anvendelighet i andre laboratorie-teknikker ikke blitt vurdert men bruk i slike tester ikke nødvendigvis ekskluderes.

2 SAMMENDRAG OG BAKGRUNN

Deoxyribonucleic acid finnes naturlig i minst 3 forskjellige former: en høyrehendt double stranded form (dsDNA); en venstrehendt double stranded form (Z-DNA) og en single stranded form (ssDNA). Alle former inneholder determinanter og antistoffer mot disse kan produseres. dsDNA og ssDNA autoantistoffer finnes rutinemessig hos pasienter med autoimmune sykdommer.

Antistoff mot ssDNA (mot nucleotidbaser av DNA molekylet) er ikke sykdomsspesifikke men finnes hos pasienter med revmatoid artritt, SLE, systemisk sklerose og ikke-immunologiske tilstander. De utgjør en hovedbestanddel av flest antinukleære antistoffer (ANAs), og ses som et homogent mønster ved indirekt immunofluorescens tester.

Antistoff mot dsDNA er mot den fosfat deoxyribos ryggrad av DNA molekylet. De er mindre alminnelig enn antistoffer mot ssDNA men har større klinisk signifikans av 2 hovedgrunner. For det første, finnes høye titre av anti dsDNA nesten utelukkende hos SLE pasienter og for det andre, korrelerer antistofftitre bra med sykdomsaktivitet. Dette gjør at dette er en viktig markør for både sykdomsprogresjon og sykdomsalvorlighetsgrad samt graden av respons ved eventuell behandling.

Flere metoder har blitt brukt i løpet av årene for å påvise antistoffer mot dsDNA, såsom passiv agglutinasjon, komplement fiksering og RIA. Hemoflagellaten *C. luciliae* brukt som substrat ved indirekte immunofluorescens tester er en sensitiv og spesifikk screening test. *C. luciliae* har en organelle, som kalles for en kinetoplast; en gigant mitokondrion som inneholder dsDNA (ref. 1) men som er tilsynelatende fri for histoner og andre pattedyrs nucleære antigener. Fordelen med *C. luciliae* basert screening for dsDNA antistoffer er dets spesifisitet pga sammensetningen av kinetoplasten (refs 2 and 3).

3 PRINSIPP

Dette produktet bruker en indirekte immunofluorescens teknikk (ref. 4). Pasient prøver og relevante kontroller inkuberes med *C. luciliae* substrat. Ureagerte antistoffer vaskes vekk og et passende fluorescein-merket konjugat tilsettes. Ubundet konjugat vaskes vekk som før. Slides ses under et fluorescens mikroskop hvor dsDNA positive prøver avgir eple-grønn fluorescens av kinetoplasten.

4 REAGENSER

4.1 *C. luciliae* substrat slides (5- or 10-brønner).

Kun kit

4.2 Positiv kontroll serum som gir kinetoplastfarging, inneholder 0,099% azid. Fortynnet, ferdig til bruk.

4.3 Negativ kontroll serum, inneholder 0,099% natriumazid. Fortynnet, ferdig til bruk.

4.4 Affinitetsrenset sheep (sau) anti-human IgG (γ kjede) fluorescein isothiocyanate konjugat (FITC) inneholder 0,099% natriumazid. Fortynnet, ferdig til bruk.

4.5 1% Evans Blue, til motfarging hvis ønskelig.

4.6 Fosfatbufferert saltvann (PBS), a 20x konsentrat i flytende form.

4.7 Trekkepapir for å tørke rundt brønnene etter vask.

4.8 Monteringsmedium, inneholder antifalningsmiddel (DABCO, 1, 4, diazabicyclo [2.2.2] octane).

4.9 Dekselplater

5 FORSIKTIGHET

Alle donorer som har levert serum anvendt i dette kit, er serumtestet og funnet negative for Hepatitt B virus overflateantigen og antistoff mot Human Immunodeficiency Virus (HIV 1 & 2). Disse tester kan allikevel ikke garantere fraværet av smittsomme stoffer. Korrekt håndterings og avfallbehandlingsmetoder bør etableres som ved alle potensielt smittsomme materialer og kun personer utdannet i slike metoder bør tillates å bruke dette kit..

Dette produktet må kun brukes av personer med relevant trening og kun til anvendelse som beskrevet her. Bruksanvisningen må følges nøye.

Konjugat og kitkontrollene inneholder 0,099% natriumazid som konserverende middel og må brukes med forsiktighet – må ikke svelges eller komme i kontakt med huden eller slimhinner. Hvis kontakt skjer, skylle med store mengder vann og kontakt lege. Eksplosive metallazider kan dannes ved kontakt med bly eller kobber rørdninger; Kastede reagenser må skylles ned med store mengder vann for å unngå opphopning av azid.

6 OPPBEVARING OG STABILITET

Uåpnede kiter må oppbevares ved 2-8°C og kan brukes inntil utløpsdatoen. MÅ IKKE FRYSES. Når slidene er fjernet fra folieposen må de brukes øyeblikkelig. Ferdig fortynt PBS buffer kan oppbevares i inntil 1 måned ved 2-8°C. FITC konjugatet må så mye som mulig beskyttes mot sollys, fluorescerende eller u.v lys. Alle andre reagenser må oppbevares ved 2-8°C.

7 PRØVETAKING

Bruk serumprøver. Blodprøver bør innhentes ved venepunktur og man lar blodet koagulere og serumet separeres så snart som mulig for å unngå hemolyse. Serumet kan oppbevares ved 2-8°C inntil 7 dager før bruk, eller i lengre perioder ved -20°C eller lavere (ref. 7). Serumet må ikke fryses og tines mer enn en gang. Unngå bruk av lipemiske, hemolytiske eller mikrobielt forurensede sera da lavere titre eller uklare fargingsmønstre kan oppstå.

8 METODIKK

8.1 Materiaer inkludert

50T kit FK002.1

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (Crithidia slide – 5-brønner)
- 1 x 1mL *Positiv Control for dsDNA* (Positiv kontroll for dsDNA fortynnet)
- 1 x 1mL *Negativ Control for dsDNA* (Negativ kontroll for dsDNA fortynnet)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC*
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (motfarging)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS konsentrat, x20)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Monteringsmedium)
- 20 x *Blotters* (tørkepapir)
- 10 x *Coverslips* (dekselplater, 22 x 70mm)
- 1 x bruksanvisning

250T Kit FK002.2

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (Crithidia slide – 10-brønner)
- 1 x 1mL *Positiv Control for dsDNA* (Positiv kontroll for dsDNA fortynnet)
- 1 x 1mL *Negativ Control for dsDNA* (Negativ kontroll for dsDNA fortynnet)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC*
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (motfarging)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS konsentrat, x20)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Monteringsmedium)
- 50 x *Blotters* (tørkepapir)
- 25 x *Coverslips* (dekselplater, 22 x 70mm)
- 1 x bruksanvisning

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- 10 x 5-brønner slides, 25 x 10-brønner slides, 100 x 10-brønner slides
- 1 x bruksanvisning

8.2 Tilleggsmaterialer og utstyr

- 8.2.1 Destillert vann til fortynning av PBS konsentrat.

- 8.2.2 Beholder for PBS buffer plast trykflasker for første vask med PBS.
- 8.2.3 Mikropipetter og engangstips for pasientprøver.
- 8.2.4 Fuktekammer for inkuberingsstrinn (f.eks. Magnetic Staining Chamber Code -BD010).
- 8.2.5 Fluorescensmikroskop med 495nm exciter filter og 515nm barrier filter.
- 8.2.6 Hvis kun substratslidene brukes vil følgende produkter også være nødvendig (Binding Site koder er angitt der hvor det er relevant): positiv kontroll (FA109), negativ kontroll (CON 92), anti Human IgG (γ) Aff FITC (FA004, fortynnet, ferdig til bruk, eller AF004, fortynn 1/100-1/400 for bruk), PBS (CON 3.3), Evans Blue (CON 93, optional), monteringsmedium (CON 195.1/2), tørkepapir, dekselplater.

8.3 Test prosedyre

Kvalitetssikring

Positive og negative kontroller må brukes hver gang man tester prøver. Det anbefales at en kontroll brukes hver gang man kjører testen.

- 8.3.1 **Monteringsmedium:** Fjern monteringsmedium fra kjøleskapet og la det nå romtemperatur (18-28°C) før bruk.
- 8.3.2 **Fortynning av PBS konsentrat:** Fortynn PBS konsentrat med destillert water (1 del PBS konsentrat + 19 deler destillert vann) og bland sammen. PBS brukes for å fortynne pasientprøver og som vaskebuffer. NB: bruk hele PBS konsentrat kun hvis hele kitet skal brukes innen 1 måned.
- 8.3.3 **Fortynning av pasientprøver:**
Screening: Fortynn pasientprøver 1/10 ved å tilsette 50 μ L serum til 450 μ L PBS buffer.
Titrering: Lag seriefortynninger for positive (allerede screenet) prøver med PBS buffer (f.eks. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 osv). For eksempel: Ta 100 μ L av 1/10 fortynningen, bland med 100 μ L PBS for å få 1/20 fortynning. Gjenta for flere fortynninger.
- 8.3.4 **Substrat slides:** La substrat slides nå romtemperatur (18-28° C) før de tas ut av folieposen(e). Merk dem for identifikasjon og legg i fuktammeret, tilsett 1 dråpe avresp. positiv kontroll og negative kontroll i brønnene 1 og 2, Tilsett 25 μ L fortynnet pasient prøve til hver av de resterende brønnene.
- 8.3.5 **Slideinkubering.** Inkubér slidene i 30 minutter i et fuktammer ved romtemperatur (18-28°C).
- 8.3.6 **PBS vask.** Fjern slidene fra fuktammeret og gi et kort skylt med PBS trykflasken. Sprut ikke direkte på brønnene. Plassér slidene i et stativ og dypp ned i PBS og rør i 10 minutter.
- 8.3.7 **Tilsetting av fluoresceinkonjugat.** Rist av eksess PBS og tørk rundt brønnene med trekkpapir. Sett slidene tilbake i fuktammeret og dekk øyeblikkelig hver brønn med 1 dråpe fluoresceinkonjugat. IKKE LA BRØNNENE STÅ UDEKKET LENGRE ENN 15 SEKUNDER. Hvis substratet tørker ut blir resultatene påvirket meget negativt.
- 8.3.8 **Slideinkubering.** Inkubér slidene i 30 minutter i et fuktammer ved romtemperatur (18-28°C) i mørket.
- 8.3.9 **PBS vask.** Vask igjen som i trinn 8.3.6. Opsjonell Kontrafarging: Tilsett 2-3 dråper 1% Evans Blue per 100mL PBS før du dypper slidene ned i PBS beholderen.
- 8.3.10 **Montering med dekselet.** Fjern en slide ad gangen fra PBS vask. Tørk fort rundt brønnene og tilsett 1 dråpe monteringsmedium til hver brønn. Bring sliden langsomt i kontakt med dekselet og unngå luftbobler, som ikke må fjernes hvis de oppstår. Tørk vekk eksessmedium fra rundt kanten av dekselet.
- 8.3.11 **Se slidene under et fluorescens mikroskop.** Slides bør ses så snart som mulig men kan oppbevares 2-8°C i mørket i inntil 1 uke uten signifikant tap av fluorescens.

9 RESULTER

9.1 Kvalitetssikring

Positivkontrollen skal avgi spesifikk eple-grønn kinetoplast farging med eller uten farging av cellekjernen. Negativkontrollen skal avgi matt grønn farging av organismen uten påvisbar fluorescens. Hvis kontrollene ikke ser ut som beskrevet her, er testen ugyldig og må gjentas.

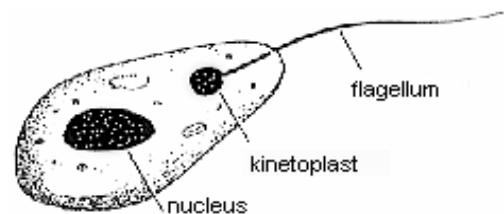
9.2 Tolkning av resultater

9.2.1 Negativt resultat

En prøver anses som negativ hvis spesifikk kinetoplast farging er lik eller mindre enn negativkontrollen, uansett farging av andre strukturer som basal body, flagellum eller cellekjernen.

9.2.2 Positivt resultat

En prøve anses som positiv hvis kinetoplastfarging er større enn på negativ kontrollen. For å klart differensiere kinetoplasten fra cellekjernen, se nøye på positivkontrollen. Kinetoplasten er alltid lokalisert nærmere flagellum (se bildet).



NB: Hvert laboratorie bør etablere når et positivt resultat har klinisk betydning.

TOLK RESULTATER VED Å BRUKE KUN EN ENESTE GODT DEFINERT ORGANISME.

10 BEGRENSNINGER AV PROSEDYREN

- 10.1 Lyskilden, filter og optikken i forskjellige merker av fluorescerendemikroskop vil påvirke testens sensitivitet. Mikroskopets funksjon påvirkes signifikant ved korrekt vedlikehold og spesielt sentring av kvikksølvdamplampen og bytting av lampen etter det anbefalte tidsintervall.
- 10.2 Medikamentindusert SLE pasienter kan ha flere dsDNA antistoffer tilstede (ref. 5).
- 10.3 Pasienter på steroidbehandling kan være negative for dsDNA antistoffer (ref. 6).
- 10.4 Mikrobielt forurenset serum må ikke brukes da dette kan resultere i falske positive eller falske negative svar.
- 10.5 Ved uvanlig mye bakgrunnsfarging eller hvis resultatene er vanskelige å tolke kan det hjelpe å bruke en PBS kontroll.
- 10.6 Denne testen brukes kun som diagnostisk hjelpemiddel. Et positivt resultat kan tyde på visse sykdommer, som må bekreftes ved kliniske funn og andre serologiske tester. Testresultatene er ikke diagnostisk bevis for tilstedeværelse eller fravær av sykdom.

FDA (USA) Information – se forsiden på den Engelske produktinformasjon.

11 FORVENTEDE VERDIER

C. luciliae substrat ble brukt for å teste pasienter med forskjellige bindevevssykdommer og også 50 randomiserte normale blodgivere. Resultatene angis i tabellen nedenfor:

Pasientgruppe	Antall	Positiv <i>C. luciliae</i> farging
SLE	100	32
Revmatoid Artritt	10	0
Scleroderma	10	0
Sjögren's Syndrom	5	0
Normale	50	0

12 VURDERINGSKARAKTERISTIKA

12.1 Presisjon

Fem slides fra den samme batch ble testet med en kjent kontrollprøve, som ble fortynnet til sluttunkt. Alle fem slides ga en sluttunkt titer på 1/5120, og dermed viste at det ikke var noen signifikant forskjell mellom de 5 slidene i den samme batch. Tre slides fra forskjellige batcher ble testet med en kjent kontrollprøve, som ble fortynnet 1/25. Alle 3 slides ga en ekvivalent fargingsintensitet (2+).

12.2 Sensitivitet

Testsensitiviteten og påvisningsgrensen er avhengig av mikroskopet som er brukt. Det finnes ingen internasjonal kalibrator tilgjengelig til standardisering.

12.3 Spesifisitet

46 sera med kjente høye nivåer av antistoffer mot dsDNA og 50 normale sera ble testet med The Binding Site *C. luciliae* kit og en ekvivalent kommersielt tilgjengelig IFA kit. Farging var klassifisert som positiv (+), sterk positiv (2+) og negativ (-):

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

13 REFERANSER

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 SAMMENDRAG AV PROSEDYREN

- 14.1 Ekvilibrere monteringsmedium til romtemperatur.
- 14.2 Fortynn PBS med destillert vann.
- 14.3 Fortynn pasientsera 1/10 med PBS.
- 14.4 Fjern slides fra kjøleskapet og ekvilibrere til romtemperatur (18-28°C).
- 14.5 Fjern slide fra folieposen og plassér i et fuktammer. Tilsett 25µL av kontroller og pasientsera.
- 14.6 Inkubér i 30 minutter ved romtemperatur (18-28°C).
- 14.7 Vask slides med en strøm av PBS. Vask slides i 10 minutter i et stativ.
- 14.8 Tørk grundig rundt hver brønn, sett slide tilbake i fuktammeret og tilsett øyeblikkelig 1 dråpe fluorescenskonjugat.
- 14.9 Inkubér slides i 30 minutter.
- 14.10 Vask igjen som i trinn 7.
- 14.11 Tørk rundt brønnene; tilsett monteringsmedium til hver brønn og dekselplate.
- 14.12 Se slides under et fluorescens mikroskop.