

CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA KITEK/SZUBSZTRÁT LEMEZEK

Hungarian

In-vitro diagnosztikai alkalmazásra

**Termékkód: FK002._
FS002._**

A termék gyártója:

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

Magyarországon forgalmazza:

Diagnosticum RT

H-1047 Budapest Attila u. 126

Telefon: +36 (01) 369-0739, 369-3684, 380-4500

Fax: +36 (01) 369-4383

www.diagnosticum.hu



1 JAVASOLT ALKALMAZÁS

Ez a termék (kit vagy szubsztrát lemezek) a keringő anti- duplaszálú DNS (dsDNA) autoantitestek szűrésére és titer meghatározására szolgál. Ez az autoantitest szisztémás lupus erythematosus (SLE) diagnosztizálásához és monitorozásához használható marker. Az önállóan forgalmazott lemezek más tesztszrendszerekben való alkalmazhatóságát nem ellenőrizték, de ez nem zárja ki az ilyen alkalmazást.

2 ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MAGYARAZAT

A dezoxiribonukleinsav a természetben legalább három különböző formában található meg: egy jobbra tekert kettős szálú konformáció (dsDNA), egy balra tekert kettős szálú forma (Z-DNA) és egy nagy egyszálú konformáció (ssDNA). Mindegyik forma tartalmaz olyan antigén-determinánsokat, amelyekkel szemben autoantitestek termelődhetnek. dsDNA és ssDNA autoantitestek rendszeresen kimutathatók autoimmun betegségben szenvedő egyéneknél.

Az ssDNA elleni antitestek (a DNS nukleotid bázisai ellen irányulnak) nem specifikusak valamilyen meghatározott betegségre, megtalálhatók rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus (SLE), szisztémás sclerosis eseteiben, és más, nem immunológiai körkörülményekben. A legtöbb sejtmag-ellenes antitest (ANA) fő alkotórészei, indirekt immunfluoreszcens módszerrel homogén mintázattal tűnnek fel.

A dsDNA elleni antitestek a DNS molekula foszfát-dezoxiribóz váza ellen irányulnak, nem olyan gyakoriak, mint az ssDNA ellenes antitestek, de klinikai jelentőségük nagyobb, két fő okból. Először is, magas titerű anti-dsDNA szinte kizárólag SLE betegekben fordul elő, másodsorban, az antitest titer a betegség aktivitásával jól korrelál. Ezáltal a betegség progressziója és súlyossága szempontjából is fontos marker, és a kezelésre adott válasz megítélésére is alkalmas.

Az évek során számos módszert alkalmaztak dsDNA ellenes antitestek kimutatására, úgymint passzív agglutináció, komplement fixálás és RIA. A haemoflagelláta indirekt immunfluoreszcens assay szubsztrátumaként alkalmazva érzékeny és specifikus szűrőmódszer kidolgozását tette lehetővé. A *C. luciliae*-nak van egy sejtisztervecskéje, amit kinetoplasztnak neveznek. Ez egy óriási mitokondrium, ami dsDNA-t tartalmaz (1. Irod.) de mentes hisztonoktól és más emlős sejtmag-antigénektől. A *C. luciliae* alapú anti-dsDNA szűrőmódszer előnye a kinetoplaszt összetételének köszönhető specifitása (2, 3).

3 A MÓDSZER ELVE

A vizsgálatot indirekt immunfluoreszcens eljárással (4) végezzük. A betegek mintáit és a megfelelő kontrollokat inkubáljuk a *C. luciliae* szubsztráttal. A nem kötődött antitesteket kimossuk, és egy megfelelő, fluoreszcenccel jelölt konjugátumot adjuk a szubsztráthoz. A szabadon maradt konjugátumot az előzőhöz hasonlóan mosással eltávolítjuk. A lemezeket fluoreszcens mikroszkóppal megtekintjük. A dsDNA pozitív minták a kinetoplaszt almozóld fluoreszcens festődését okozzák.

4 REAGENSEK

4.1 *C. luciliae* szubsztrát lemezek (5 vagy 10 mérőhely).

Csak kitekben:

4.2 **Pozitív kontroll szérum**, amely kinetoplaszt-festődést eredményez. 0,099% Na-azidot tartalmaz. Előhígítva, használatra kész.

4.3 **Negatív kontroll szérum**, 0,099% Na-azidot tartalmaz. Előhígítva, használatra kész.

4.4 **Affinitási eljárással tisztított birka anti-humán IgG (γ-lánc) fluorescein izotiocianát (FITC) konjugátum**, 0,099% Na-azidot tartalmaz. Előhígítva, használatra kész.

4.5 **1% Evans Kék**, kontrasztfestéshez (amennyiben szükséges).

4.6 **Foszfátpufferrel beállított fiziológiás só (PBS)**, 20-szoros koncentrációjú, folyékony halmazállapotban.

4.7 **Itatócs**, a szubsztrát környezetének mosást követő nedvességmentesítésére.

4.8 **Beágyazó médium**, kifulladás ellen védő adalékkal (DABCO, 1,4 diazabicyclo [2.2.2] octane).

4.9 **Fedőlemezek**.

5 FIGYELMEZTETÉS

A kitben található emberi szérumot ellenőrizték szérum szinten, és negatívnak találták Hepatitis B felszíni antigénre, valamint Hepatitis C vírus és Humán Immundeficiencia Vírus (HIV 1 & 2) ellenes antitestekre. Nem garantálható, hogy a szérum mentes valamennyi fertőző ágensztől. Potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és megfelelő kezelési és megsemmisítési eljárásokat kell alkalmazni; kizárólag ilyen feladatra képzett és gyakorlattal rendelkező személy végezheti a vizsgálatokat.

Ez a termék kizárólag a megjelölt célra, megfelelően képzett személy által használható. Ajánlott a leírt munkafolyamat pontos betartása.

A kit egyes összetevői 0,099% Na-azidot tartalmaznak tartósítószerként, így fokozott gondot kell fordítani a kezelésre. Tilos meginni, kerülni kell a bőrrel és nyálkahártyákkal való érintkezést. Amennyiben mégis ilyen baleset történik, nagy mennyiségű vízzel történő lemosást követően forduljon orvoshoz! Ólom és réztartalmú vízvezeték csövekkel robbanásveszélyes fém-azid komplex képződhet. Ezért a reagensek megsemmisítésekor bő vízes öblítésre van szükség az azid-lerakódás megakadályozása céljából.

6 TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A felbontatlan kitek/lemezek 2-8°C között tárolhatók, felhasználhatók a csomagoláson jelzett időpontig. TILOS FAGYASZTANI! Ha a lemezeket egyszer a védőfóliából kivettük, azonnal fel kell használni. A hígított PBS puffer egy hónapig tárolható 2-8°C-on. A FITC konjugátumot lehetőség szerint övni kell a napfénytől, fluoreszcens és UV sugárzástól. Minden más reagenst is célszerű 2-8°C között tárolni.

7 MINTAVÉTEL ÉS KEZELÉS

A vizsgálati anyag: szérum. Alvadás után a szérumot a lehető legrövidebb időn belül válassza el a sejtetektől. A szérum 2-8°C között tárolható vizsgálat előtt legfeljebb 7 napig (7), vagy szükség esetén kisebb részletekben lefagyaszta eltartható hosszabb ideig -20°C-on vagy az alatti hőmérsékleten. TILOS egynél többször kiolvasztani és visszafagyasztani. Kerülje a lipémiás, hemolitikus vagy mikrobiológiailag szennyezett savók használatát, mert ezekkel a titer csökkenése vagy bizonytalan festődési mintázat fordulhat elő.

8 MÓDSZER

8.1 A tesztben megtalálható anyagok

50T kit FK002.1

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (Crithidia lemez – 5 mérőhely)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Pozitív kontroll dsDNA-ra, előhígítva)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Negatív kontroll dsDNA-ra, előhígítva)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (anti-humán IgG (γ) AFF FITC)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Evans Kék kontrasztfesték)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS koncentrációjú, x20)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Beágyazó médium)
- 20 x *Blotters* (Itatócs)
- 10 x *Coverslips* (Fedőlemezek, 22 x 70mm)
- 1 x használati utasítás

250T kit FK002.2

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (Crithidia lemez – 10 mérőhely)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Pozitív kontroll dsDNA-ra, előhígítva)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Negatív kontroll dsDNA-ra, előhígítva)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG (γ) AFF FITC* (anti-humán IgG (γ) AFF FITC)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Evans Kék kontrasztfesték)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (PBS koncentrációjú, x20)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Beágyazó médium)
- 50 x *Blotters* (Itatócs)
- 25 x *Coverslips* (Fedőlemezek, 22 x 70mm)
- 1 x használati utasítás

FS002.1, FS002.2, FS002.3

- lemezek: 10 x 5 mérőhely, 25 x 10 mérőhely, 100 x 10 mérőhely
- 1 x használati utasítás

8.2 Szükséges kiegészítő anyagok

8.2.1 Desztillált víz a PBS koncentrációjú hígításához.

8.2.2 Edény a PBS puffer tárolására és műanyag flakon a kezdeti PBS-es mosáshoz.

8.2.3 Mikropipetták és eldobható pipettahegyek a betegek mintáinak felviteléhez.

8.2.4 Nedves kamra az inkubációs lépésekhez (pl. Magnetic Staining Chamber, BD010).

8.2.5 Fluoreszcens mikroszkóp 495nm-es gerjesztési és 515nm-es emissziós szűrővel.

8.2.6 Szubsztrát lemezek önálló használatához az alábbiakra is szükség lehet (The Binding Site kódokkal): pozitív kontroll (FA109), negatív kontroll (CON 92), anti-Humán IgG (γ) Aff FITC (FA004, előhígított, használatra kész; vagy AF004, ami 1/100-1/400 arányban hígítandó használat előtt), PBS (CON 3.3), Evans Blue (CON 93 szükség szerint), beágyazó médium (CON 195.1/2), itatócsok, fedőlemezek.

8.3 A vizsgálat kivételzése

Minőségi kontroll

Pozitív és negatív kontrollok használata szükséges minden beteg-minta sorozat vizsgálata alkalmával. Ajánlatos egy kontrollt titálni minden assay során.

8.3.1 **Beágyazó médium:** Vegye ki a hűtőből a beágyazáshoz szükséges anyagot és hagyja, hogy elérje a szobahőmérsékletet (18-28°C) mielőtt szükség lenne rá.

8.3.2 **A PBS koncentrációjú hígítása:** Hígítsa a PBS koncentrációjú desztillált vízzel (1 rész PBS koncentrációjú + 19 rész desztillált víz) és keverje össze. A PBS-t használja a betegek mintáinak hígítására és mosó pufferként. NB: csak akkor hígítsa a kitben található teljes PBS mennyiséget, ha a teljes kit felhasználásra kerül egy hónapon belül.

8.3.3 A betegek mintáinak hígítása.

Szűréshez: Hígítsa a betegek mintáit 1/10 arányban úgy, hogy 50µL szérumot ad 450µL PBS pufferhez.

Titrláshoz: Készítsen sorozat hígítást a szűrővel pozitív mintákból PBS pufferrel (pl. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 és 1/320 stb.). Példa: Vegyen 100 μ L-t az 1/10-es beteg-minta hígításából, keverje össze 100 μ L PBS-sel, hogy 1/20-as hígítást kapjon. Ismételje ezt az eljárást a további felező hígításokhoz.

8.3.4 **Subsztrát lemezek.** Hagyja a lemez(ek)e)t szobahőmérsékletűre (18-28°C) melegedni mielőtt a csomagolás(ok)ból kivesszi. Jelölje megfelelően a lemezeket, helyezze a nedves kamrába, és adjon egy-egy cseppet a pozitív és a negatív kontrollból az 1 és 2 mérőlyukba. A maradék mérőhelyekre cseppentsen 25 μ L-t a hígított beteg-mintákból.

8.3.5 **A lemezek inkubálása.** Inkubálja a lemezeket 30 percig nedves kamrában szobahőmérsékleten (18-28°C).

8.3.6 **Mosás PBS-sel.** Vegye ki a lemezeket a nedves kamrából és öblítse röviden PBS-sel, összenyomható műanyag flakon segítségével. Ne spricceljen közvetlenül a lyukakba. Helyezze a lemezeket állványra, merítse PBS-be és rázza vagy kevertesse 10 percig.

8.3.7 **A fluorescens konjugátum felvitele.** Rázza le a PBS fölösleget a lemezekről és itassa le a széleket a kitben lévő itatóssal. Helyezze vissza a lemezeket a nedves kamrába és haladéktalanul fedje minden egyes mélyedés tartalmát egy-egy csepp fluorescens konjugátummal. **NE HAGYJA AZ ANYAGOT FEDETLENÜL 15 MP-NÉL HOSSZABB IDEIG.** A subsztrát kiszáradása súlyosan veszélyezteti az eredményt.

8.3.8 **A lemezek inkubálása.** Inkubálja a lemezeket 30 percig a nedves kamrában szobahőmérsékleten (18-28°C) sötét helyen.

8.3.9 **PBS mosás.** Mossa a lemezeket ismét a 6. lépésben leírt módon. Kontrasztfestéshez: 2-3 csepp 1%-os Evans Kék/100mL PBS a lemezek beritése előtt.

8.3.10 **Takarás fedőlemezzel.** Egyszerre csak egy lemezt vegyen ki a PBS fürdőből. Gyorsan itassa le a mélyedések környékét és adjon egy-egy csepp beágyazó anyagot minden lyukba. Óvatosan süllyessze a lemezt a fedőlemezre. Vigyázzon, hogy ne alakuljon ki buborék, de ha mégis megtörténne, ne próbálja eltávolítani. A médium fölösleget gondosan törölje le.

8.3.11 **Tekintse meg a lemezeket fluorescens mikroszkóp alatt.** A kész lemezeket a lehető legrövidebb időn belül kell értékelni, de szükség esetén eltarthatók sötét helyen, 2-8°C-on 1 hétig a fluoreszcencia lényeges csökkenése nélkül.

9 EREDMÉNYEK

9.1 Minőségi kontroll

A pozitív kontroll specifikusalmazöld kinetoplaszt festődést kell adjon, miközben a mag is festődhet, de ez nem szükséges. A negatív kontrollal tompa zöld festődést mutat a sejt, megkülönböztetett fluorescens jelölődés nélkül. Ha a kontrollok másképpen viselkednek, a vizsgálatot meg kell ismételni.

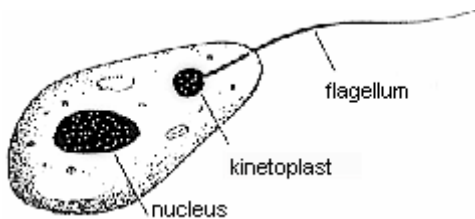
9.2 Az eredmények értékelése

9.2.1 Negatív

A mintát negatívnak tekintjük, ha a specifikus fluoreszcencia a negatív kontrollal megegyező erősségű, vagy annál gyengébb.

9.2.2 Pozitív

A mintát pozitívnak tekintjük, ha a kinetoplaszt festődése erősebb, mint a negatív kontroll esetében. Abban, hogy a kinetoplasztot világosan meg lehessen különböztetni a magtól, a pozitív kontroll megtekintése segít. A kinetoplaszt mindig a flagellumhoz közelebb helyezkedik el (lásd az ábrán).



NB: Minden laboratóriumnak meg kell határoznia, hogy milyen szintű pozitívítást tekint klinikailag szignifikánsnak.

CSAK EGYEDI, JÓL FELISMERHETŐ ORGANIZMUSOK FESTŐDÉSÉT ÉRTÉKELJE!

10 A MÓDSZER KORLÁTAI

10.1 A különböző gyártmányú fluorescens mikroszkópok fényforrása, színszűrő és optikája befolyásolja a módszer érzékenységét. A mikroszkóp teljesítményét a karbantartás jelentősen befolyásolja. Különösen fontos a higanygőz lámpa centrálása, és cseréje a megadott működési idő lejártá után.

10.2 Gyógyszer-indukált SLE-ben dsDNA antitestek előfordulhatnak (5).

10.3 Steroid terápia negatív eredményt okozhat az anti-dsDNA vizsgálatok (6).

10.4 Mikrobiológiai szempontból szennyezett szérumot ne használjon, mert téves pozitív vagy téves negatív eredményt okozhat.

10.5 Ha szokatlannak tűnik a háttér fluoreszcencia intenzitása, vagy bármilyen más probléma adódik az értékeléskor, egy kontrollt lehet beállítani PBS-sel.

10.6 Ez a kit csak kiegészítő információt nyújt a diagnózis felállításához. A pozitív eredmény bizonyos betegségek fennállására utalhat, de ezt klinikai adatokkal és más szerológiai tesztekkel meg kell erősíteni. Ezzel a módszerrel kapott eredmények nem tekinthetők diagnosztikai bizonyítéknak valamely betegség meglétére vagy hiányára vonatkozóan.

FDA (USA) Információ - lásd az angol nyelvű melléklet első oldalán*

11 VARHATÓ ÉRTEKEK

Crithidia luciliae subsztráton tesztelték ismert kötőszöveti betegségben szenvedő páciensek mintáit 50 válogatás nélküli normál véradóval együtt. Az eredmények az alábbi táblázatban láthatók:

Páciens csoport	Esetszám	Pozitív <i>C. luciliae</i> festődés
SLE	100	32
Rheumatoid Arthritis	10	0
Scleroderma	10	0
Sjögren szindróma	5	0
Véradók	50	0

12 MŰKÖDÉSI JELLEMZŐK

12.1 Pontosság

Ugyanabból a kitből származó 5 lemezen tesztelték egy ismert kontroll mintát, végpontig titrlással. Mind az öt lemez 1/5120-as hígításban érte el a végpontot, igazolva, hogy nincs lényeges különbség a lemezek között adott gyártási sorozaton belül. Három lemezt eltérő gyártási számú kitekből 1/25-ös hígítású ismert kontrollal tesztelték. Mind a három lemez egyforma festődési intenzitást adott (2+).

12.2 Érzékenység

A tesztek érzékenysége (sensitivity) és a kimutathatóság határa a teszt értékelések használtmikroszkóptól függ. Ennek standardizálására nincs nemzetközi kalibrátor.

12.3 Specifititás

46 nagy mennyiségű anti-dsDNA antitestet tartalmazó, és 50 normál szérumot tesztelték a „The Binding Site” *C. luciliae* kittel, és egy másik, kereskedelmi forgalomban beszerezhető IFA kittel. A festődés értékelése: pozitív (+), erősen pozitív (2+) és negatív (-) volt.

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

13 IRODALOM

- 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.
- Somerfield, S.D.; Roberts, M.W.; Booth, R.J. (1981): Double-stranded DNA antibodies: comparison of four methods of detection. J. Clin. Path. 34: 1032-1035.
- Sontheimer, R.D.; Gilliam, J.D. (1978): An immunofluorescence assay for double stranded DNA antibodies using the *Crithidia luciliae* kinetoplast as a double stranded DNA substrate. J. Lab. Clin. Med. 91: 550-558.
- Weller, T.H.; Coons, A.H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in Vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789-794.
- Epstein, W.V. (1975): Specificity of SLE serum antibody for single-stranded and double-stranded DNA configuration. J. Rheum. 2: 215-220.
- Ballou, S.P.; Kushner, I. (1979): Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. Arthritis Rheum. 22: 321-328.
- Protein Reference Unit Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed A Milford Ward. J Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

14 ÖSSZEFOGLALÁS

- Engedje a beágyazó médiumot szobahőmérsékletűre melegedni.
- Hígítsa a PBS-t desztillált vízzel.
- Hígítsa a betegek mintáit 1/10 arányban PBS-sel.
- Vegye ki a lemezeket a hűtőből és hagyja szobahőmérsékletűre melegedni (18-28°C).
- Távolítsa el a lemeztől a csomagoló fóliát és helyezze a lemezt a nedves kamrába. Adjon 25 μ L kontrollt illetve hígított beteg-szérumot a mérőlyukakba.
- Inkubálja a lemezeket 30 percig szobahőmérsékleten (18-28°C).
- Öblítse le a lemezeket PBS-sugárral, majd mossa egy állványra helyezve 10 percig.
- Itassa fel a nedvességet a lyukak körül. Helyezze vissza a lemezt a nedves kamrába és adjon azonnal egy csepp fluorescens konjugátumot a mintákhoz.
- Inkubálja a lemezeket 30 percig.
- Ismételje a 14.7 lépésben leírt mosási procedúrát.
- Itassa fel a nedvességet a lyukak körül. Adjon minden lyukba egy csepp beágyazó médiumot és fedje fedőlemezzel.
- Tekintse át a lemezeket fluorescens mikroszkóppal.