

# CRITHIDIA LUCILIAE dsDNA KIT/SUBSTRAT OBJEKTGLAS

Swedish

## För *in-vitro* diagnostik

Produktkod: FK002.\_  
FS002.\_

Produkten tillverkad av:

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

Försäljning i Sverige genom:

Immunkemi F&D AB, Veddesta Centrum, 175 72 Järfälla

Telefon: +46 (0)8 583 61500

Fax: +46 (0)8 583 61501

e-post: sales@immunkemi.se



### 1 ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna produkt (kit eller substratobjektglas) är avsedd att användas för screening och titrering av cirkulerande anti dubbelsträngat DNA (dsDNA) autoantikroppar. Denna autoantikropp är en markör vid diagnos och övervakning av systemisk lupus erythematosus (SLE). För objektglas som säljs separat har inte användbarheten i andra detektionssystem utvärderats även om en sådan kan vara möjlig.

### 2 SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Deoxiribonukleinsyra förekommer naturligt i minst tre olika former: en högervriden dubbelsträngad struktur (dsDNA); en vänstervriden dubbelsträngad struktur (Z-DNA) och en enkelsträngad struktur (ssDNA). Autoantikroppar kan bildas mot determinanter i alla dessa strukturer. Autoantikroppar mot dsDNA och ssDNA påträffas normalt hos patienter med autoimmuna sjukdomar.

Antikroppar mot ssDNA (mot DNA molekylen nukleotidbaser) är inte specifika för en särskild sjukdom, de återfinns hos patienter med reumatoid artrit, systemisk lupus erythematosus (SLE), systemisk skleros och andra icke-immunologiska störningar. De är en huvudbeståndsdel i de flesta anti nukleära antikroppar (ANA), och uppvisar ett homogent mönster vid indirekt immunfluorescens analyser.

Antikroppar mot dsDNA är riktade mot DNA molekylen fosfatdeoxyriboskärna. Dessa är mindre vanliga än antikroppar mot ssDNA men är mer kliniskt signifikanta på grund av två huvudsaker. Först, därför att höga titrar av anti dsDNA återfinns praktiskt taget endast hos SLE patienter och därefter för att antikroppstitrar korrelerar väl med sjukdomsaktiviteten. Detta tillhandahåller en viktig markör både för sjukdomens utveckling och dess svårighetsgrad samt graden av reaktion på efterföljande behandling.

Ett flertal metoder har använts genom åren för att upptäcka antikroppar mot dsDNA, såsom passiv agglutination, komplementfixering och RIA. Hemoflagellaten, *C.luciliae* använd som ett substrat i indirekt immunfluorescens-analyser, är ett känsligt och specifikt screening test. *C.luciliae* har en organell som kallas kinetoplast; en väldigt mitokondrie som innehåller dsDNA (ref. 1) men är uppenbarligen fri från histoner och andra nukleära daggdjursantigener. Fördelen med *C.luciliae* baserad screening för dsDNA antikroppar är dess specificitet, grundad på kinetoplastens sammansättning (ref. 2 och 3).

### 3 PRINCIP

Denna produkt använder en indirekt immunfluorescens teknik (ref. 4). Patientprover och lämpliga kontroller inkuberas med *C.luciliae* substratet. De antikroppar som inte reagerat tvättas bort och sedan tillsätts lämpligt fluoresceinmärkt konjugat. Obundet konjugat tvättas bort och objektglasen granskas i ett fluorescensmikroskop. dsDNA positiva prover ger en klargrön fluorescens i kinetoplasten.

### 4 REAGENS

- C.luciliae* substrat objektglas (5 eller 10 brunnar).  
Endast kit
- Positivt kontrollserum, ger färgning av kinetoplasten, innehåller 0,099% natriumazid. Färdigspädd, färdig att användas.
- Negativt kontrollserum, innehåller 0,099% natriumazid. Färdigspädd, färdig att användas.
- Affinitetsrenad får anti-humant IgG ( $\gamma$  kedja) FITC, innehåller 0,099% natriumazid. Färdigspädd, färdig att användas.
- 1% Evans Blue, valfri kontrastfärg.
- Phosphate buffered saline (PBS) - 20x koncentrat, vätska.
- Läskapper - för att torka runt brunnarna efter tvättning.
- Monteringsmedium, innehåller DABCO, 1, 4-diazabicyclo[2.2.2]-oktan, som förhindrar blekning av fluorescens.
- Täckglas.

### 5 VARNING

Alla givare av humanserum till kitet har testats och befunnits vara negativa för hepatit B ytanigen (HBsAg), för antikroppar mot humant immunbristvirus (HIV1 och HIV2) och hepatit C virus. Dessa tester kan emellertid inte garantera frånvaron av smittämnen. Korrekt handhavande och rutiner för avfallshantering bör därför fastställas för alla potentiellt smittsamma material och endast personal med fullgod utbildning i sådana metoder skall tillåtas utföra dessa procedurer.

Denna produkt bör endast användas av personal med lämplig utbildning för angivet ändamål. Det rekommenderas att metodbeskrivningen följs.

En del av komponenterna i kitet innehåller 0,099% natriumazid som konserveringsmedel och måste hanteras med försiktighet – förtär inte och undvik kontakt med hud eller slemhinnor. Om kontakt skulle uppstå tvätta med stora volymer vatten och kontakta läkare. Explosiva metallazider kan bildas med bly och kopparrör; när reagens hålls ut, spola med stora volymer vatten för att förebygga anhopning av azid.

### 6 FÖRVARING OCH STABILITET

Öppnade kit/objektglas bör förvaras vid 2-8°C och kan då användas fram till det utgångsdatum som anges på kartongens etikett. FRYS EJ. När objektglasen har tagits ur folieförpackningen bör de användas omedelbart. Utspädd PBS-buffert kan förvaras i upp till en månad vid 2-8°C. Kitets FITC-konjugat bör i möjligaste mån ej utsättas för solljus, fluorescerande ljus eller UV-ljus. Alla reagenser bör förvaras vid 2-8°C.

### 7 PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Använd serumprover. Efter koaguleringen bör serumet separeras snarast möjligt för att undvika hemolys. Serumet kan förvaras vid 2-8°C upp till 7 dagar före analys (ref. 7), eller vid längre förvaring, alikvoterats och förvaras vid -20°C eller lägre. Serumet får INTE frysas och tinas upp mer än en gång. Undvik att använda lipemiskt, hemolyserat eller mikrobiellt kontaminerat serum, eftersom minskade titrar eller otydliga färgningsmönster kan uppstå.

### 8 METOD

#### 8.1 Material som ingår

##### 50T kit FK002.1

- 10 x *Crithidia slide* – 5-well (5-brunnars objektglas)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA* (Färdigspädd positiv kontroll)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA* (Färdigspädd negativ kontroll)
- 1 x 4,5mL *anti human IgG ( $\gamma$ ) AFF FITC* (Affinitetsrenat anti-humant IgG ( $\gamma$ ) FITC)
- 1 x 3mL 1% *Evans Blue Counterstain* (kontrastfärg)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (Koncentrat PBS buffert)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Monteringsmedium)
- 20 x *Blotters* (Läskapper)
- 10 x *Coverslips* (Täckglas, 22 x 70mm)
- 1 x Metodbeskrivning

##### 250T Kit FK002.2

- 25 x *Crithidia slide* – 10-well (10-brunnars objektglas)
- 1 x 1mL *Positive Control for dsDNA kits* (Färdigspädd positiv kontroll)
- 1 x 1mL *Negative Control for dsDNA kits* (Färdigspädd negativ kontroll)
- 1 x 12,5mL *anti human IgG ( $\gamma$ ) AFF FITC* (Affinitetsrenat anti-humant IgG ( $\gamma$ ) FITC)
- 1 x 3mL 1% *Evans Blue Counterstain* (kontrastfärg)
- 2 x 60mL *PBS concentrate (x20)* (Koncentrat PBS buffert)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Monteringsmedium)
- 50 x *Blotters* (Läskapper)
- 25 x *Coverslips* (Täckglas, 22 x 70mm)
- 1 x Metodbeskrivning

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

- 10 x 5-brunnars objektglas, 25 x 10-brunnars objektglas, 100 x 10-brunnars objektglas.
- 1 x Metodbeskrivning

#### 8.2 Ytterligare material som krävs

- 8.2.1 Destillerat vatten för att späda PBS koncentratet.
- 8.2.2 Behållare för PBS buffert och en sprutflaska i plast för första tvätt med PBS.
- 8.2.3 Mikropipetter och pipettspetsar för engångsbruk för att tillsätta patientprover.
- 8.2.4 Fuktkammare för inkuberingssteg (t.ex. "Magnetic Staining Chamber", kod BD010).
- 8.2.5 Fluorescensmikroskop med 495nm excitationfilter och 515nm barriärfilter.
- 8.2.6 Vid användning av enbart substrat objektglas, behövs även följande material (Binding Site produktkoder anges när så är möjligt): positiv kontroll (FA109), negativ kontroll (CON 92), anti humant IgG ( $\gamma$ ) AFF FITC (FA004, färdigspädd, eller AF004, spädd 1/100-1/400 före användning), PBS (CON 3.3), Evans Blue (CON 93, valfri), monteringsmedium (CON 195.1/2), läskapper, täckglas.

#### 8.3 Analysförfarande

##### Kvalitetskontroll

Positiva och negativa kontroller bör användas vid varje analystillfälle. Det rekommenderas att en kontroll titreras för varje analys.

- 8.3.1 Monteringsmedium: Ta ut monteringsmediet ur kylskåpet så att det når rumstemperatur (18-28°C) innan det ska användas.

- 8.3.2 **Spädning av PBS koncentration.** Späd PBS koncentrationen med destillerat vatten (1 del PBS koncentration + 19 delar dest. vatten) och blanda. PBS används för att späda patientprover och som tvättbuffert. OBS! Späd endast upp totalmängden av kitets PBS om hela kitet förbrukas inom en månad.
- 8.3.3 **Spädning av patientprover**  
**Screening:** Späd patientprover 1/10 genom att tillsätta 50µL serum i 450µL PBS buffert.  
**Titrering:** Gör flera spädnings av positiva screenade prover med PBS-buffert (t.ex. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 och 1/320 osv).  
 Till exempel: Tag 100µL av 1/10 spädnings, blanda med 100µL PBS för att få en 1/20 spädnings. Upprepa för ytterligare spädnings.
- 8.3.4 **Substratobjektglas.** Se till att objektglaset när rumstemperatur (18-28°C) innan de tas ur förpackningen. Märk objektglaset på lämpligt sätt, placera dem i fukt-kammaren och tillsätt en droppe positiv och negativ kontroll till vardera brunn 1 och 2. Tillsätt 25µL spädda patientprover till de återstående brunnarna.
- 8.3.5 **Inkubering av objektglas.** Inkubera objektglaset i 30 minuter i en fukt-kammare vid rumstemperatur (18-28°C).
- 8.3.6 **PBS-tvätt.** Ta ut objektglaset ur fukt-kammaren och skölj dem hastigt med PBS-sprutfaskan. Spruta inte direkt på brunnarna. Placera objektglaset i ett ställ och sänk ned i PBS och skaka eller rör om i 10 minuter.
- 8.3.7 **Tillsats av fluorescerande konjugat.** Skaka av överflödigt PBS och torka runt brunnarna med medföljande läskpapper. Sätt tillbaka objektglaset i fukt-kammaren och TILLSÄTT OMEDELBART EN DROPP FLUORESCERANDE KONJUGAT TILL VARJE BRUNN (INOM 15 SEKUNDER). Om substratet torkar ut påverkas resultaten markant.
- 8.3.8 **Inkubering av objektglas.** Inkubera objektglaset i 30 minuter i en fukt-kammare vid rumstemperatur (18-28°C) i mörker.
- 8.3.9 **PBS-tvätt.** Tvätta igen enligt beskrivningen i steg 8.3.6. Önskas kontrastfärgning tillsätts 2-3 droppar 1% Evans Blue per 100mL PBS innan glaset sätts ned.
- 8.3.10 **Montering med täckglas.** Tag ett objektglas i taget från PBS-tvätten. Torka snabbt runt brunnarna och tillsätt en droppe monteringsmedium i varje brunn. Sänk försiktigt ned objektglaset på ett täckglas. Undvik luftbubblor, men försök inte ta bort dem om de uppstår. Torka bort överflödigt medium från täckglasets kanter.
- 8.3.11 **Avläs objektglaset i fluorescensmikroskop.** Färdiga glas skall läsas så snart som möjligt, men kan förvaras i mörker vid 2-8°C upp till 1 vecka utan någon betydande fluorescensförlust.

## 9 RESULTAT

### 9.1 Kvalitetskontroll

Den positiva kontrollen skall ge specifik klargrön kinetoplast färgning med eller utan kärnfärgning. Den negativa kontrollen skall ge matt grön färgning av organismen utan märkbar fluorescens. Om kontrollen inte uppträder som beskrivet skall analysen göras om.

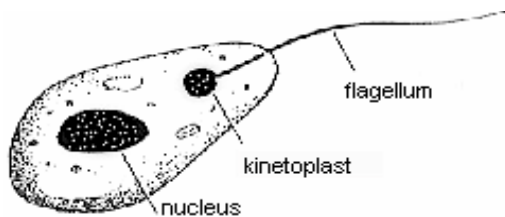
### 9.2 Tolkning av resultaten

#### 9.2.1 Negativ

Ett prov skall betraktas som negativt om den specifika kinetoplast färgningen är likvärdig med eller mindre än den negativa kontrollbrunnen, även om andra strukturer såsom basalkroppen, flageller eller kärnan färgas.

#### 9.2.2 Positiv

Ett prov anses vara positivt om kinetoplast färgningen är mer än den negativa kontrollen. För att tydligt särskilja mellan kinetoplasten och kärnan, betrakta den positiva kontrollbrunnen noga. Kinetoplasten ligger alltid närmare flagellen (se bilden nedan).



OBS: Varje laboratorium bör fastställa när ett positivt resultat ska anses vara kliniskt signifikant.

TOLKA ENDAST RESULTATEN MED HJÄLP AV ENSTAKA, VÄLDEFINIERADE ORGANISMER.

## 10 METODENS BEGRÄNSNINGAR

- 10.1 Ljuskälla, filter och optik i olika sorters fluorescensmikroskop påverkar kitets sensitivitet. Mikroskopets prestanda påverkas markant av korrekt underhåll, särskilt centrerings av kvicksilverlampan och byte av lampan med rekommenderat tidsintervall.
- 10.2 Patienter med droginducerad SLE under läkemedelsbehandling kan ha dsDNA antikroppar (ref. 5).
- 10.3 Patienter som genomgår terapi med steroider kan uppvisa negativa resultat för dsDNA antikropp (ref. 6).
- 10.4 Mikrobiell kontaminerad serum skall inte användas, eftersom falska positiva eller negativa resultat då kan förekomma.

- 10.5 Om det visar sig vara ovanligt hög bakgrundsfärgning eller om det finns några svårigheter att tolka resultaten, kan en PBS kontroll användas.
- 10.6 Detta kit används endast som ett hjälpmedel vid diagnos. Ett positivt resultat tyder på vissa sjukdomar som måste säkerställas med patientens anamnes och andra serologiska tester. Resultaten som erhålles med denna analys är inget diagnostiskt bevis på sjukdomens närvaro eller frånvaro.

FDA (USA) information – se första sidan i det engelska produktbladet.

## 11 FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Crithidia luciliae substrat används för att testa ett antal patienter med olika bindvävssjukdomar och även 50 slumpmässigt valda friska blodgivare. Resultaten visas i tabellen nedan:

Patientgrupp	Antal	Positiv C.luciliae färgning
SLE	100	32
Reumatoid artrit	10	0
Scleroderma	10	0
Sjögrens syndrom	5	0
Friska individer	50	0

## 12 PRESTANDA-KARAKTERISTIKA

### 12.1 Precision

Fem glas från samma lot testades med ett känt kontrollprov som var spätt till slutpunkt. Alla fem glaset gav en titer vid slutpunkt på 1/5120, vilket visar att det inte finns någon signifikant skillnad i prestanda mellan glas från samma batch. Tre glas från olika batcher testades med ett känt kontrollprov som var spätt 1/25. Alla tre glaset gav en överensstämmande färgintensitet (2+).

### 12.2 Sensitivitet

Testets känslighet och detektionsgräns är beroende av det använda mikroskopet. Det finns ingen internationell kalibrator tillgänglig för standardisering.

### 12.3 Specificitet

46 sera kända att innehålla hög nivå av antikroppar mot dsDNA och 50 sera från friska patienter testades med The Binding Site C.luciliae kit och med ett likvärdigt kommersiellt tillgängligt IFA kit. Färgningen klassificerades som positiv (+), starkt positiv (2+), och negativ (-):

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

## 13 REFERENSER

- 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 Handbook of Autoimmunity (3<sup>rd</sup> Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

## 14 SAMMANFATTNING AV METODBESKRIVNINGEN

- 14.1 Se till att monteringsmediet uppnår rumstemperatur.  
 14.2 Späd PBS med destillerat vatten.  
 14.3 Späd patientserum 1/10 med PBS.  
 14.4 Se till att substratobjektglaset uppnår rumstemperatur (18-28°C).  
 14.5 Tag ut objektglaset ur folieförpackningen och placera i en fukt-kammare. Tillsätt 25µL av kontroller och patientserum.  
 14.6 Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (18-28°C).  
 14.7 Skölj objektglaset med PBS. Tvätta objektglaset i 10 minuter i ett ställ.  
 14.8 Torka runt varje brunn, sätt tillbaka objektglaset i fukt-kammaren och tillsätt omedelbart en droppe fluorescenskonjugat.  
 14.9 Inkubera objektglaset i 30 minuter.  
 14.10 Tvätta igen enligt steg 7.  
 14.11 Torka runt brunnarna, tillsätt monteringsmedium till varje brunn och sätt på täckglas.  
 14.12 Granska objektglaset i fluorescensmikroskop.

© Immunki 2007