

**ANTI- nDNA protilátky  
(nDNA)**

 Nepřímá imunofluorescence  
**CRITHIDIA LUCILIAE**

KÓD 44825 24 testů	KÓD 44818 60 testů	KÓD 44817 120 testů
KÓD 44820 10 x 6 testů		KÓD 44819 10 x 12 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C		
Reagencie pro kvalitativní stanovení anti-DNA protilátek Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.		

**PRINCIP METODY**

Anti-nDNA protilátky v séru se vážou na odpovídající antigen přítomný v *Crithidia luciliae*. K detekci komplexu antigen-protilátka je použito sérum s anti-human imunoglobulinem značeným fluoresceinem. Vyhodnocení se provádí fluorescenčním mikroskopem<sup>1</sup>.

	OBSAH		
	kód 44825	KÓD 44818	KÓD 44817
A. Sklíčka	4 x 6 testů	10 x 6 testů	10 x 12 testů
B. PBS (10x)	1 x 100 ml	1 x 100 ml	1 x 100 ml
C+ nDNA Pozitivní kontrola	1 x 0,3 ml	1 x 0,3 ml	2 x 0,3 ml
C- Negativní kontrola	1 x 0,3 ml	1 x 0,3 ml	2 x 0,3 ml
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 ml	1 x 3 ml	2 x 3 ml
E. Montovací Medium	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml
F. Odsávací papír	1 x 10	1 x 10	1 x 10
	Kód 44820	Kód 44819	
A. Sklíčka	10 x 6 testů	10 x 12 testů	

**SLOŽENÍ**

- A. Sklíčka:** *Crithidia luciliae* fixované v každé jamce.  
**B. PBS (10x):** Fosforečnan sodný 112,5 mmol/L, fosforečnan draselný 30 mmol/L, chlorid sodný 1,15 mol/L, azid sodný 0,95 g/L, pH 7,2.  
**C+. nDNA Pozitivní kontrola:** Lidské sérum obsahující anti-nativní protilátky (n-DNA), azid sodný 0,95 g/L.  
**C- Negativní kontrola:** Lidské sérum, azid sodný 0,95 g/L.  
**D. IgG FITC/Evans (R,CI):** Kozí anti-human IgG konjugovaný s fluorescein isotiokyanátem (FITC), Evansova modř 0,01g/L, azid sodný 0,95 g/L.  
**E. Montovací médium:** Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, azid sodný 0,95 g/L.  
**F. Odsávací papír.**

*Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledována negativními na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potencionálně infekčním materiálem.*

**SKLADOVÁNÍ**

Skladujte při 2-8°C.  
 Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich používání.

**Známky zhoršení kvality:**

- Kapalně komponenty: Přítomnost částic, zákal
- Sklíčka: natržení sáčku, makroskopické defekty na tkáňových preparátech, jako je poškrábání nebo sloupnutí.

**POMOCNÉ REAGENCIE**

- B. PBS (10x)**  
**D. IgG FITC/Evans (R,CL),** konjugát s kontrastní Evansovou modrou  
**E. Montovací médium**  
**C+. nDNA pozitivní kontrola**

M44825i-16  
 12/2017/VE  
 05/2017

**C- Negativní kontrola**
**PŘÍPRAVA REAGENCIÍ**

**PBS:** Naředte reagent B destilovanou vodou v poměru 1/10. Stabilní 1 měsíc při 2-8 ° C, pokud byly dodrženy při skladování doporučené teploty, reagent byl dobře uzavřen a nedošlo ke kontaminaci během jeho používání. Všechny ostatní reagenty jsou dodávány připravené k přímému použití.

**PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ**

- Zvlhčovací komůrka
- Promývací nádoba
- Krycí skříčka 24 x 60 mm
- Fluorescenční mikroskop s excitačním filtrem 495 nm a 525 nm emisním filtrem pro FITC vizualizaci.

**VZORKY**

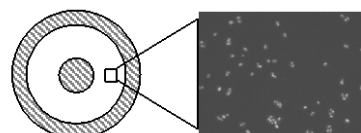
Sérum, plazma odebraná standardním postupem. Stabilní po dobu 1 týdne při 2-8°C.  
 Před testováním zředte vzorek 1/10 v PBS (Viz. příprava reagenty). K titraci pozitivních vzorků ředte dvojkovou řadou v PBS, přičemž začnete ředěním 1/10.

**PRACOVNÍ POSTUP**

1. Vytemperujte reagenty a vzorky na pokojovou teplotu.
2. Kápněte 1 kapku (25 µL) naředěného vzorku, nebo kontroly do každé jamky (A). Ujistěte se, že jamka je kompletně pokrytá. (Poznámka 1).
3. Inkubujte sklíčka 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) ve zvlhčovací komůrce.
4. Nakloňte sklíčko a opatrným poklepáváním o filtrační papír odstraňte přebytečné kapky vzorku. Zabraňte zkřížené kontaminaci séra.
5. Opláchněte krátce v lehkém proudu PBS (viz. příprava reagenty) (Poznámka 2).
6. Sklíčka pořádně promyjte v nádobě obsahující PBS po dobu 5 minut. Poté PBS vyměňte a promývání zopakujte.
7. Opatrně sklíčko osušte s použitím speciálního odsávacího papíru. Jamky nevysušujte, musí zůstat vlhké po celou dobu procedury.
8. Do každé jamky přidejte 1 kapku reagenty D. Sklíčka inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) ve zvlhčovací komůrce.
9. Promyjte podle bodu 6 a osušte podle bodu 7.
10. Přidejte do každé jamky několik kapek reagenty E a opatrně zakryjte krycím sklíčkem tak, aby nevznikly vzduchové bubliny.

**ODEČÍTÁNÍ**

Sklíčka vyhodnocujte s použitím fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 250-400x). Pro lepší výsledky sklíčka vyhodnocujte okamžitě. Pro odečet zvolte část zorného pole mezi střední a krajní zónou v části se stejnou vzdáleností mezi buňkami a se stejnou jasností jader. Intenzita fluorescence v okrajích a ve středu není charakteristická.



jamka

vybraná část



# ANTI -nDNA protilátky (nDNA)



## ANTI- nDNA protilátky ( nDNA)

### Nepřímá imunofluorescence CRITHIDIA LUCILIAE

KÓD 44825 24 testů	KÓD 44818 60 testů	KÓD 44817 120 testů
KÓD 44820 10 x 6 testů		KÓD 44819 10 x 12 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C		
Reagencie pro kvalitativní stanovení anti-DNA protilátek Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.		

Crithidia luciliae je hemoflagelát s modifikovaným mitochondriem, zvaným kinetoplast, obsahující dvoušroubovici DNA (nDNA), která není vázána na histony a zjevně postrádá jakýkoliv jiný nukleární antigen. Kinetoplast je kruhovitá organela menší než jádro a je umístěna mezi jádrem a bazálním tělískem<sup>(2,3,4)</sup>.

Séra vykazující jasnou fluorescenci kinetoplastu při doporučeném ředění by měla být hodnocena jako pozitivní. Fluorescenci může dávat také jádro, bazální tělísko nebo bičík, ale posuzuje se pouze fluorescence kinetoplastů. Pozitivní séra lze titrovat. Titr séra je definován jako nejvyšší zředění dávající pozitivní výsledek.

#### KONTROLA KVALITY

Pozitivní (C+) a negativní kontrola (C-) by měla být testována společně se vzorkem pacienta, za předpokladu, že byla zakoupena se soupravou kód 44825, 44817 a 44818, aby se verifikovala pravdivost zkoušky.

Pozitivní kontrola (C+) by měla vykazovat výše popsaný specifický obraz.

Negativní kontrola (C-) by neměla dávat žádný specifický obraz. Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

#### CHARAKTERISTIKA TESTU

IgG FITC/Evans je kalibrován proti WHO Mezinárodnímu standardu pro FITC značený ovčím anti-human IgG kvůli znázornění protilátek v lidském séru.

Správnost: Výsledky získané těmito reagenty nevykazovaly systematické odlišnosti ve srovnání s referenčními reagenty. Detaily tohoto srovnání jsou k dispozici na vyžádání.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Imunofluorescenční test využívající Crithidia luciliae pro diagnostiku anti-nDNA protilátek má nejen vysokou diagnostickou specifitu, ale i vysokou diagnostickou sensitivitu pro Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Jsou to nejčastěji nacházené autoprottilátky spojené se SLE: u 95% pacientů se SLE s ledvinovým poškozením, 50-70% pacientů se SLE bez poškození ledvin a u 40% pacientů s neaktivním SLE. Anti-nDNA protilátky se zřídka objeví i u zdravých jedinců<sup>(6)</sup>.

BioSystems anti-nDNA souprava byla testována 80 séry pacientů se SLE, a zdravých dárců. Výsledky jsou popsány níže.

	N	POZ	NEG	Citlivost	Specifita
SLE (systémový lupus erythematosus)	43	29	14	67%	100%
SLE bez renálního zapojení	25	15	10	60%	100%
SLE s renálním zapojením	18	14	4	78%	100%
Ostatní autoimunitní onemocnění	20	0	20		
Zdraví jedinci	17	0	17		

Klinická diagnóza by neměla být uzavřena jen na základě výsledků jednoho testování, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

#### POZNÁMKA

1. Nedotýkejte se tkáňových řezů v jamkách během zkoušky.
2. Použijte stříčku, nebo pipetu na promytí sklíček. Zabraňte zkřížené kontaminaci mezi jednotlivými vzorky.

#### LITERATURA

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the Crithidia luciliae kinetoplast: a study with ant-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
4. Conrad K, Schöbber W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 29.8.2019

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: [www.biosystems.es](http://www.biosystems.es).

Český návod je k dispozici na: [www.iktrading.cz](http://www.iktrading.cz)

#### Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: +421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a . LF UK,

tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166