



COD 44825 24 determinaciones	COD 44818 60 determinaciones	COD 44817 120 determinaciones
COD 44820 10 x 6 determinaciones	COD 44819 10 x 12 determinaciones	
CONSERVAR A 2-8°C		
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-nDNA Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico		

## ANTICUERPOS ANTI-nDNA (nDNA)

Imunofluorescencia Indirecta  
CRITHIDIA LUCILIAE

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-nDNA del suero se unen a su correspondiente antígeno presente en *Crithidia luciliae*. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia<sup>1</sup>.

### CONTENIDO

	COD 44825	COD 44818	COD 44817
A. Portaobjetos	4 x 6 det.	10 x 6 det.	10 x 12 det.
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C +. Control Positivo nDNA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	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. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 10	1 x 10	1 x 10

	COD 44820	COD 44819
A. Portaobjetos	10 x 6 determinaciones	10 x 12 determinaciones

### COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** *Crithidia luciliae* fijadas en cada pocillo.
- B. PBS (10x):** Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Control Positivo nDNA:** Suero humano con anticuerpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L
- D. IgG FITC/Evans:** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sodio 0,95 g/L
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- F. Papel secante.**

*Los sueros humanos utilizados en la preparación del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.*

### CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

#### Indicaciones de deterioro:

- Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.

- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en la preparación de células.

### REACTIVOS AUXILIARES

- B. PBS (10x).**
- D. IgG FITC/Evans,** conjugado con contratinción de azul de Evans.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje
- C+. Control Positivo nDNA.**
- C-. Control Negativo.**

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**PBS:** Efectuar una dilución 1/10 del Reactivo B con agua destilada. Estable 1 mes a 2-8°C, si se conserva a la temperatura recomendada, bien cerrado y se tiene cuidado para evitar contaminaciones durante su uso.

Los demás componentes están listos para su uso.

### EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Cubreobjetos de 24 x 60 mm
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

### MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/10 en PBS (ver Preparación de Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/10.

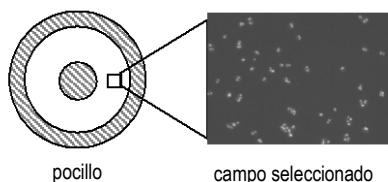
### PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (25 µL) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos (A), procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.

7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. La preparación de células debe permanecer siempre húmeda.
8. Depositar una gota de Reactivo D en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Reactivo E sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

## LECTURA

Examinar el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación de la zona indicada en el esquema, entre el centro y la periferia del pocillo, con distribución de células uniformes. La intensidad de marcaje de la periferia o del centro del pocillo no es representativa de la preparación.



La *Crithidia luciliae* es un hemoflagelado que posee una mitocondria modificada, denominada kinetoplasto, que contiene DNA de doble hélice (nDNA), no asociado a histonas, y que aparentemente no presenta ningún otro antígeno. El kinetoplasto es un orgánulo de aspecto redondeado, de tamaño inferior al núcleo y situado entre éste y el corpúsculo basal <sup>(2,3,4)</sup>.

La observación de marcaje fluorescente específico en el kinetoplasto a la dilución recomendada indica un resultado positivo. El núcleo, el cuerpo basal o el flagelo pueden originar marcaje fluorescente pero sólo debe considerarse la fluorescencia del kinetoplasto.

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

## CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (C+) y el Control Negativo (C-) suministrados con los kits cod 44825, cod 44817 y cod 44818 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo no debe proporcionar marcaje específico alguno.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

## CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

El IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-IgG humanas de oveja conjugadas con FITC.

Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La determinación de anticuerpos anti-dsDNA por inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae* tiene una elevada especificidad diagnóstica, y una sensibilidad diagnóstica moderadamente elevada para el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE). Estos anticuerpos son los más frecuentemente detectados en SLE: 95% en pacientes con SLE con implicación renal, 50 – 70% en pacientes con SLE sin implicación renal y 40% en pacientes con SLE inactivo. Los anticuerpos anti-dsDNA raramente se encuentran en individuos sanos <sup>(5)</sup>.

El kit de anti-nDNA de BioSystems fue usado con 80 sueros de pacientes con SLE así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

	N	POS	NEG	Sens.	Espec.
<b>SLE (<i>lupus eritematoso sistémico</i>)</b>	43	29	14	<b>67%</b>	<b>100%</b>
<i>SLE sin implicación renal</i>	25	15	10	60%	100%
<i>SLE con implicación renal</i>	18	14	4	78%	100%
<b>Otras Enfermedades Autoinmunes</b>	20	0	20		
<b>Controles sanos</b>	17	0	17		

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## NOTAS

1. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Melnicoff 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.
5. Conrad K, Schöblier W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002