

## **MANUAL DE INSTRUCCIONES:**

**1) NOMBRE DEL PRODUCTO:** IFIFLUOR MULTITEST nDNA (Crithidia luciliae)

**2) USO A QUE ESTA DESTINADO Y LEYENDA USO IN VITRO:**

Equipo de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos anti-DNA nativo sobre Crithidia luciliae. Uso in vitro.

**3) NÚMERO DE UNIDADES DE ANÁLISIS:**

El equipo permite 20 - 40 - 60 determinaciones de sueros individuales.

**4) FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

El empleo de la inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos séricos o el reconocimiento de inmunoglobulinas en tejidos ha sido internacionalmente aceptado desde el trabajo original de Coons.

La presencia de anticuerpos contra distintos componentes nucleares ha sido encontrada en enfermedades del tejido conectivo como Lupus Eritematoso Sistémico (95%), Esclerodermia (73%), Sjogren (50%), Artritis Reumatoidea (20%), Hepatitis Crónica Autoinmune (50%), Cirrosis Biliar Primaria (35%) (2,3,4).

Los primeros hallazgos de anticuerpos anti-DNA (ácido desoxirribonucleico, ADN) nativo doble cadena (nDNA), presentes en el suero de los pacientes con LES (Lupus Eritematoso Sistémico) se produjeron en 1957. Desde ese momento se ha acumulado una cantidad de evidencias que demuestran que los anticuerpos anti-nDNA son prácticamente específicos de LES en actividad, generalmente con compromiso renal. Se supone que los complejos inmunes producidos por los autoanticuerpos anti nDNA están involucrados en la patogenia de los casos graves de LES. Se ha determinado que los anticuerpos anti nDNA ocurren en el 66% de los pacientes con LES, generalmente asociados a fases agudas de la enfermedad.

Los anticuerpos anti-nDNA no tienen especificidad de especie o de órgano. El equipo IFIFLUOR MULTITEST nDNA utiliza como sustrato improntas de Crithidia luciliae que poseen un kinetoplasto (mitocondrion). Este hemoflagelado presenta una importante cantidad de DNA nativo, doble cadena, concentrado en el kinetoplasto, que normalmente se ubica entre el núcleo y la base del flagelo. Este método fue desarrollado por Aarden y col. en 1975 se basa en la alta concentración de nDNA que contiene el kinetoplasto de la C. luciliae. Estudios de Deegan y col. (1978) permitieron comparar la técnica IFI con la técnica de RIA. Tanto el RIA como el ELISA brindan resultados reproducibles y cuantitativos, sin embargo presentan problemas de interpretación ya que reconocen anticuerpos de baja avidéz, que no son específicos del LES en actividad.

La técnica de IFI es más específica ya que no detecta los anticuerpos de baja avidéz, permitiendo detectar el LES en actividad. La titulación de los anticuerpos anti-DNA es muy útil en el seguimiento de los pacientes con LES ya que permite el monitoreo de la respuesta de los pacientes a la terapia.

El equipo IFIFLUOR MULTITEST nDNA (Crithidia luciliae) emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de auto-anticuerpos séricos dirigidos contra el nDNA. El suero del paciente en una dilución adecuada, se enfrenta con las improntas que contienen el parásito. Los anticuerpos específicos, si están presentes, se unen al sustrato antigénico, particularmente en la zona del kinetoplasto (mitocondrion) del parásito. Luego de lavar para eliminar los componentes no unidos, los anticuerpos unidos reaccionan con la antigamma globulina marcada con FITC. Un segundo lavado elimina los elementos no unidos. Finalmente, luego de montados y cubiertos con cubreobjetos, se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia.

**5) RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO**

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LAS MUESTRAS: El suero debe diluido 1/10. Por ejemplo 0,1ml de suero en 0,9 ml de buffer BFS. De ser necesario titular, hacer las diluciones con buffer BFS. **NO DILUIR LOS CONTROLES DEL EQUIPO, SON LISTOS PARA USAR**

3. PREPARACION DE LAS IMPRONTAS:

A) Retirar los portaobjetos del envase, dejar secar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

B) Sembrar los sueros controles positivos, negativos y muestras a procesar. Precaución de no tocar con la pipeta las áreas reactivas, dejando caer suavemente la gota de la dilución sobre el área reaccionante.

4. INCUBACION: Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), en una cámara húmeda tapada para evitar la evaporación de las muestras.

5. LAVADO: Sacar los portaobjetos y lavarlos con abundante BFS derramando con una pipeta el líquido directamente sobre cada área para evitar la contaminación entre las mismas. Sumergir los portaobjetos 5 minutos en BFS en un frasco tipo Coplin agitando suavemente. Retirar el BFS y reemplazarlo por BFS fresco y dejarlo 5 min más en reposo. El lavado puede prolongarse más tiempo sin afectar los resultados.

6. INCUBACION CON ANTIGAMMA GLOBULINA HUMANA MARCADA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCENCIA. (diluirlo previamente con BFS según rótulo). Sacar los portaobjetos del baño con BFS. Secar con papel de filtro entre las áreas y cubrirlas con la ANTIGAMMA. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos. La cámara húmeda debe estar tapada para evitar la evaporación de la antigamma.

7. LAVADO: Repetir paso 5.

8. MONTAJE: Sacudir suavemente los portaobjetos sobre papel de filtro. Secar entre las áreas con papel de filtro, cuidando de no tocar las áreas reactivas. Montar con cubreobjetos escrupulosamente limpios y con una gota de medio de montaje. Cubrir los portaobjetos suavemente evitando la formación de burbujas que dificultan la lectura.

9. LECTURA: Leer en lo posible dentro de las primeras horas. Se pueden conservar en heladera 2-8°C por algunos días sellando los bordes del cubreobjeto con esmalte de uñas.

#### **6) INSTRUCCIONES PARA SU CONSERVACION:**

Inmediatamente de recibir el equipo guardar las improntas en freezer a -20°C y el resto del equipo en heladera de 2-8°C.

#### **7) FORMA DE PRESENTACION:**

Equipos de 20, 40 y 60 determinaciones.

#### **8) COMPOSICION, DESCRIPCION CUALI-CUANTITATIVA DE LOS COMPONENTES. INDICACIONES ACERCA DE LA PREPARACION DE LOS COMPONENTES EN CASO DE NO SER LISTOS PARA USO**

##### MATERIALES PROVISTOS

Según sean 20, 40 o 60 determinaciones:	20 det.	40 det.	60 det
Portaobjetos de 7 áreas reactivas (5 det + 2 controles)	4	8	12
Antigamma globulina humana marcada con FITC	0.10 ml	0.15 ml	0.20 ml
Sobre de buffer fosfato salino pH 7,2 ± 0.2 para reconstituir a 1 litro	1	2	3
Suero humano control positivo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Suero humano control negativo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Medio de montaje	3 ml	5 ml	5 ml
Cubreobjetos (opcional)	4	8	12
Instrucciones de uso	1	1	1

##### PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LA ANTI-GAMMA GLOBULINA HUMANA: Diluir el volumen a utilizar en BFS de acuerdo a la dilución recomendada en el rótulo del frasco.

##### MATERIALES REQUERIDOS , NO PROVISTOS

- Agua destilada o deionizada para preparar el BFS
- Tubos de ensayo para las diluciones de muestras y la anti-gamma
- Gradillas adecuadas
- Pipetas de 5 ml, pipetas automáticas
- Cámara húmeda o placas de petri con papel embebido en agua destilada
- Frascos tipo Coplin
- Cronómetro
- Microscopio de fluorescencia equipado para observar fluoresceína

**9) MUESTRAS A EMPLEAR . CONDICIONES DE OBTENCION DE LA MISMA.** Se debe emplear suero, no usar muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas. Si no se procesarán inmediatamente los

sueros, se pueden conservar congelados a -20°C por un tiempo prolongado. PRECAUCION: Evitar los ciclos de congelamiento-descongelamiento de las muestras.

## **10) CALCULO DE RESULTADOS, UNIDADES DE EXPRESION, ORIGEN DE LOS PATRONES UTILIZADOS O DE SU EQUIVALENCIA EN ESTANDARES INTERNACIONALES**

### **I) CALCULO DE RESULTADOS Y UNIDADES DE EXPRESION:**

-Es importante distinguir el kinetoplasto, que se encuentra próximo al flagelo y es más pequeño que el núcleo. La lectura debe realizarse sobre parásitos que presenten una morfología conservada.

-Los resultados se expresan como positivos si se observa una fluorescencia verde manzana en el kinetoplasto del parásito, localizado entre el núcleo y la base del flagelo de parásito a una dilución 1/10. Son negativos los sueros que no presentan fluorescencia en esa organela.

-Se recomienda titular los sueros positivos, ya que títulos mayores o iguales a 1/160 sugieren de LES en actividad.

IMPORTANTE: No confundir la fluorescencia del kinetoplasto con la fluorescencia de la porción basal del flagelo, de la cual no se ha reportado ningún significado clínico.

-Se puede observar una fluorescencia importante en el núcleo de la *C. luciliae* en los sueros positivos para FAN (ANA), pero en **NINGUN** caso puede informarse un resultado positivo para FAN (ANA) utilizando solamente *C. luciliae*, debe utilizarse el sustrato específico (Improntas de hígado o células Hep-2).

Los equipos IFIFLUOR MULTITEST nDNA están estandarizados y chequeados contra preparaciones de referencia para autoanticuerpos para nDNA del Center for Diseases Control (CDC) de Atlanta, EEUU.

### **11) INTERVALO DE NORMALIDAD O INTERVALO TERAPEUTICO:**

El título empleado para los sueros hace que solamente se visualice fluorescencia en los sueros positivos.

## **12) DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DEL SISTEMA: SENSIBILIDAD, PRECISION, EXACTITUD, ESPECIFICIDAD, POTENCIA, ESTABILIDAD.**

**Sensibilidad:** Desde los primeros trabajos de Coons se reconoce que la técnica de inmunofluorescencia tiene una alta sensibilidad para detectar anticuerpos. Sin embargo la sensibilidad puede ser afectada por una variedad de factores externos (tipo de microscopio, intensidad de la lámpara y su tiempo de uso, sistema de filtros, la aptitud del observador, etc). La sensibilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-DNA es mayor a 95% para LES. Este test también es útil para detectar casos de LES subclínico en pacientes con FAN (ANA) positivo.

**Precisión:** Se han realizado repeticiones de el ensayo para una serie de 10 sueros positivos, de diferentes títulos, incluyendo positivos débiles y fuertes. En ningún caso los resultados difirieron en más de un título, tanto intraensayo como interensayo.

**Especificidad:** Se han testado sueros positivos para diferentes patologías autoinmunes y parasitarias, obteniéndose en todos los casos resultados negativos.

La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

**Estabilidad:** Conservando el equipo en las condiciones especificadas, el material no sufre deterioro dentro del plazo de actividad fijado. La anti-gamma diluída no debe reutilizarse y debe ser preparada fresca en cada ensayo. El buffer BFS es estable durante 4 semanas a 2-8°C. Se recomienda filtrar el BFS una vez reconstituido.

## **13) PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE SU USO. LIMITACIONES DEL METODO, SUSTANCIAS INTERFERENTES, ETC.**

### PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:

-Los componentes de suero humano utilizados en la preparación de los controles de este equipo han sido encontrados no reactivos para la presencia de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), anticuerpos antiviral de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1+2) y Hepatitis C. Dado que ningún test diagnóstico puede ofrecer una seguridad absoluta acerca de la ausencia de los virus HIV, Hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos basados en productos humanos deben ser tratados como potencialmente infectivos.

-No usar los reactivos contenidos en el equipo después de la fecha de vencimiento impresa en el equipo.

-Todas las incubaciones deben realizarse en cámara húmeda o en una placa de Petri que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.

-Se deben mantener húmedas las áreas reactivas durante toda la técnica (evitar cualquier técnica de secado artificial como: secado al aire, con estufa y/o secadores). Después de los pasos de lavado, se

recomienda remover el exceso de humedad con papel absorbente; secar los bordes laterales externos del portaobjetos y secar con cuidado entre las áreas, sin tocar las áreas reactivas.

-Algunos de los componentes de este equipo contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas explosivas. Cuando se descartan los reactivos, dejar fluir abundante agua para evitar la formación de estos compuestos.

-Nunca pipetear con la boca o permitir que muestras de pacientes entren en contacto con la piel.

-Todos los materiales usados en este ensayo, incluyendo los reactivos, muestras y materiales para limpieza deben ser descartados de manera que se inactiven los agentes infecciosos. Se recomienda utilizar en la descontaminación, hipoclorito de sodio al 1%, durante un tiempo igual o mayor a 30 minutos.

-La técnica indicada se desarrolla a temperatura ambiente, considerada como un rango de 18-25°C, las desviaciones de ese rango de temperaturas producirán alteraciones en la performance de esta técnica, por ello se recomienda respetar ese rango de temperatura para las incubaciones.

-Sólo para uso diagnóstico in vitro.

#### LIMITACIONES

-El usuario del equipo debe leer cuidadosamente el inserto. El cumplimiento estricto del protocolo es indispensable para obtener resultados confiables. Ante cualquier duda comunicarse con nuestro Servicio de Asesoría Técnica.

-El exceso de lípidos en el suero a testear produce una reacción "filming" (película que encubre la reacción específica). No confundir con reacción positiva.

-La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

#### **14) BIBLIOGRAFIA:**

-AARDEN A, DE GROOT ER, FELTKAMP TEW. ANN. NY. ACAD. SCI. 1975, 254: 505-510.

-DEEGAN MJ, WALKER SE, LOWELL SE. AM. J. CLIN. PATH. 1978, 69: 599-604.

-COONS AH, CREECH HJ, JONES RM, THE DEMONSTRATION OF NEUMOCOCCAL ANTIGEN IN LISSIES BY THE USE OF FLUORESCENT ANTIBODY. J. IMMUNOL 1942, 45:159-170

-NAKAMURA RM, DEODHAR S. LABORATORY TESTS IN THE DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE DISORDERS. AM. SOC. CLIN. PATHOL, 1976, CHICAGO.

-SEPULVEDA C. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LAS NEFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO. INMUNOLOGIA CLINICA 1987, 3:14-23

-TAN EM. AUTOANTIBODIES TO NUCLEAR ANTIGENS (ANA). THEIR IMMUNOBIOLOGY AND MEDICINE. ADV. IMMUNOL. 1982, 33:167-240.

-CEPELLINI R, POLLI E, CELADA E. A DNA-REACTING FACTOR IN SERUM OF PATIENTS WITH LUPUS ERYTHEMATOSUS DIFFUSUS. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1957, 96: 572

#### **15) ESTABLECIMIENTO IMPORTADOR Y/O ELABORADOR. NOMBRE DEL DIRECTOR TECNICO, DOMICILIO LEGAL Y EN CASO DE PRODUCTOS IMPORTADOS TOTALMENTE TERMINADOS O FRACCIONADOS DEBERA CONSTAR EL ORIGEN DE ELABORACION (NOMBRE DE LA FIRMA Y DIRECCION)**

Establecimiento elaborador: LABORATORIO IFI

Directora Técnica: Bioq. Liliana Roquel

Domicilio Legal: Chile 523 (1603) Villa Martelli - Buenos Aires

#### **16) LEYENDA "PRODUCTO DE DIAGNOSTICO AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL, NUMERO"**

Producto de diagnóstico autorizado por el Ministerio de Salud y Acción Social Nro.