



COD 44825 24 determinações	COD 44818 60 determinações	COD 44817 120 determinações
COD 44820 10 x	COD 44819 10 x	
CONSERVAR A 2-8°C		
Reagentes para a determinação dos anticorpos anti-nDNA Só para uso <i>in vitro</i> nos laboratórios clínicos		

ANTICORPOS ANTI-nDNA (nDNA)

Imunofluorescência Indirecta
CRITHIDIA LUCILIAE

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos anti-nDNA do soro são unidos ao seu correspondente antígeno presente na *Crithidia luciliae*. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e visualizam-se por microscopia de fluorescência¹.

CONTEÚDO

	COD 44825	COD 44818	COD 44817
A. Lâminas	4 x 6 poços	10 x 6 poços	10 x 12 poços
B. PBS (20x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Controlo Positivo nDNA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Controlo 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. Meio de Montagem	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel Absorvente	1 x 4	1 x 10	1 x 10

	COD 44820	COD 44819
A. Lâminas	10 x 6 poços	10 x 12 poços

COMPOSIÇÃO

- A. Lâminas:** *Crithidia luciliae* fixadas em cada poço.
- B. PBS (20x):** Fosfato de sódio 225 mmol/L, fosfato de potássio 60 mmol/L, cloreto sódico 2,3 mol/L, azida de sódio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Controlo Positivo:** Soro humano com anticorpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sódio 0,95 g/L.
- C-. Controlo Negativo:** Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans:** Anticorpos de cabra anti-imunoglobulinas IgG humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L.
- E. Meio de Montagem:** Glicerol 78%, fosfato de sódio 6 mmol/L, fosfato de potássio 1,6 mmol/L, cloreto de sódio 60 mmol/L, azida de sódio 0,95 g/L.
- F. Papel absorvente.**

Os soros humanos utilizados na preparação do controlo negativo e do controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. No entanto, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os reagentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta, sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

- Componentes líquidos: Presença de partículas, turvação.
- Lâminas: Rupturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens na preparação das células.

REAGENTES AUXILIARES

- **Cod 44825, 44818 e 44817** não precisam de reagentes auxiliares.
- **Cod 44819 e 44820** precisam dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:
 - B. PBS (20x)** (cod 44592)
 - D. IgG FITC/Evans** (cod 44697)
 - E. Meio de Montagem** (cod 44694)
- **C+. Controlo Positivo nDNA:** Soro humano com anticorpos anti-DNA nativo (nDNA), azida de sódio 0,95 g/L (cod 44542)

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efectuar uma diluição 1/20 do Reagente B com água destilada. Estável 1 semana a 2-8°C.

Os outros componentes estão prontos para serem utilizados.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Cuvete de lavagem
- Lamelas de 24 x 60 mm
- Microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação de 495 nm e de emissão de 525 nm para a visualização do FITC.

AMOSTRAS

Soro ou plasma recolhidos através de procedimentos standard. Estável 1 semana a 2-8°C.

Diluir as amostras 1/10 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/10.

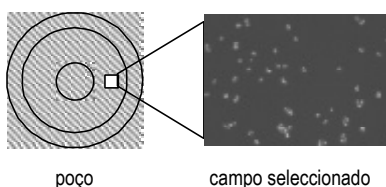
PROCEDIMENTO

1. Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
2. Depositar uma gota (50 µL) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina (A), tentando cobrir perfeitamente (Nota 1).
3. Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar as gotas das amostras inclinando a lâmina e dar pequenos golpes suavemente. Evitar a mistura dos soros.

- Eliminar o soro restante na lâmina lavando com PBS (ver preparação do Reagente). (Nota 2).
- Lavar a lâmina submergindo-a numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
- Secar cuidadosamente a lâmina utilizando o papel absorvente fornecido. A preparação das células deve permanecer sempre húmida.
- Depositar uma gota do Reagente D em cada poço. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
- Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).
- Depositar várias gotas do Reagente E sobre a lâmina e colocar uma lamela procurando evitar a formação de bolhas de ar.

LEITURA

Examinar a lâmina com um microscópio de fluorescência (250-400x). É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar campos de observação da zona indicada no esquema, entre o centro e a periferia do poço, com a distribuição de células uniformes. A intensidade da marcação da periferia ou do centro do poço não é representativa da preparação.



A *Crithidia luciliae* é um hemoflagelado que possui uma mitocôndria modificada, denominada kinetoplasto, que contém DNA de hélice dupla (nDNA), não associado às histonas, e que aparentemente não apresenta nenhum outro antígeno. O kinetoplasto é um orgânulo de aspecto redondeado, de tamanho inferior ao núcleo e situado entre este e o corpúsculo basal^(2,3,4).

A observação da marcação fluorescente específica no kinetoplasto à diluição recomendada indica um resultado positivo. O núcleo, o corpo basal ou o flagelo podem originar uma marcação fluorescente, mas só deve ser considerada a fluorescência do kinetoplasto.

As amostras positivas podem ser tituladas. Define-se o título como a diluição maior que dá resultado positivo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo Positivo (C+) e o Controlo Negativo (C-) fornecidos com os kits cod 44825, cod 44817 e cod 44818 devem ser ensaiados junto com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento do ensaio.

O Controlo Positivo deve proporcionar a marcação específica descrita no item anterior.

O Controlo Negativo não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interna, assim como os procedimentos de correcção no caso dos controlos não cumprirem com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

O IgG FITC/Evans está calibrado em comparação com o Padrão Internacional da OMS de anti-IgG humanas de ovelha conjugadas com FITC.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A determinação dos anticorpos anti-dsDNA por imunofluorescência na *Crithidia luciliae* tem uma elevada especificidade diagnóstica, contudo tem uma sensibilidade diagnóstica moderadamente elevada para o Lúpus Eritematoso Sistémico (SLE). Estes anticorpos são os que se detectam com mais frequência em SLE: 95% nos pacientes com SLE com implicação renal; 50 – 70% nos pacientes com SLE sem implicação renal; e 40% nos pacientes com SLE inactivo. Os anticorpos anti-dsDNA raramente se encontram em indivíduos saudáveis⁽⁵⁾.

O kit de anti-nDNA da BioSystems foi usado com 80 soros de pacientes com SLE assim como em doadores saudáveis. Os resultados aparecem a continuação:

	N	POS	NEG	Sens.	Espec.
SLE (<i>lúpus eritematoso sistémico</i>)	43	29	14	67%	100%
SLE sem implicação renal	25	15	10	60%	100%
SLE com implicação renal	18	14	4	78%	100%
Outras Doenças Auto-imunes	20	0	20		
Controlos saudáveis	17	0	17		

O diagnóstico clínico não deve basear-se exclusivamente no resultado deste ensaio, sendo que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

NOTAS

- Evitar tocar as células do poço durante todo o procedimento.
- Utilizar um frasco de lavagem ou pipeta para esta lavagem, evitando a possível contaminação com as amostras adjacentes.

BIBLIOGRAFIA

- Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Aarden A, 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.
- 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.
- Konstantinov KN and Russanova VR. Evidence for absence of histones in the *Crithidia luciliae* kinetoplast: a study with anti-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
- Conrad K, Schöbner W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002