

Crithidia luciliae (IF)

REF

ME 0248

Coffret



ME 0296

Coffret



ME 0201

Lame de substrat (4 puits)

ME 0202

Lame de substrat (8 puits)

Français

DEFINITION

Le coffret **Crithidia luciliae (IF)** est un test de dépistage semi-quantitatif des anticorps anti-ADN natif dans le sérum humain par une technique d'immunofluorescence indirecte sur lame.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

La mise en évidence initiale d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN a été faite chez des patients atteints de lupus érythémateux (LED) il y a plus de 40 ans⁽²⁾.

Au fil du temps, de nombreuses preuves ont été réunies montrant que les anticorps anti-ADN sont plus souvent retrouvés chez les patients ayant une atteinte rénale. La spécificité des auto-anticorps anti-nDNA est plus grande que celle des anticorps anti-nucléaires (ANA)⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁹⁾.

La méthode par immunofluorescence pour la détection des anticorps anti-ADN⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁹⁾ est une aide au diagnostic et à la différenciation des différents groupes de maladie.

PRINCIPE DU TEST

La recherche des anticorps anti-ADN natif sur une culture de *Crithidia luciliae* (parasite flagellé riche en antigène ADN natif) est réalisée sur un support solide qui est une lame de verre constituée de plusieurs puits distincts les uns des autres.

La fluorescence sera recherchée au niveau du kinétoplaste, riche en ADN natif et détectable entre le noyau et la base du flagelle.

- Dans un premier temps, l'échantillon à tester est déposé dans un puits recouvert de *Crithidia luciliae*. Si les anticorps recherchés sont présents, ceux-ci vont se fixer sur l'ADN natif.
- Après une étape de lavages éliminant les fixations non spécifiques, un conjugué anti-humain marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine est utilisé pour révéler les complexes antigène anticorps précédemment formés.
- Une seconde série de lavages permet d'éliminer l'excès de globuline.
- Après montage de la lame, la lecture est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. La présence d'anticorps anti-ADN natif se traduit par une fluorescence du kinétoplaste.

REACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT

ME 0201	Lame <i>Crithidia luciliae</i> de 4 puits
ME 0202	Lame <i>Crithidia luciliae</i> de 8 puits
ME 902.2	Conjugué fluorescent anti-IgG (2 ml)
ME 902.8	Conjugué fluorescent anti-IgG (8 ml)
ME 0022	Contrôle Positif ADN natif (500 µl)
HME NEG	Contrôle négatif (500 µl)
HME MM	Milieu de Montage Glycérol (3,5 ml)
HME PBS10	Sachet de PBS en poudre 10g (10 x 1l)
HME 12CS	Lamelles de verre 24x60mm (100 unités)

COMPOSITION DES COFFRETS

	ME 0248	ME 0296
Lames <i>Crithidia luciliae</i> SORB SLD n	12 x 4 puits	12 x 8 puits
Contrôle positif ADN natif <i>Flacon compte-gouttes contenant un sérum humain positif en anticorps anti-ADN natif.</i> Prêt à l'emploi	1 x 0,5 ml	1 x 0,5 ml
Contrôle négatif <i>Flacon compte-gouttes contenant du sérum humain négatif.</i> Prêt à l'emploi	1 x 0,5 ml	1 x 0,5 ml
Conjugué anti-IgG <i>Flacon contenant des immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines (chaînes lourdes et légères) couplée à la fluorescéine (DTAF), avec 1% de BSA et bleu Evans.</i> Prêt à l'emploi.	1 x 2 ml	2 x 2 ml
Tampon Phosphate (PBS) <i>PBS en poudre (0.01 M, pH 7.4 = 0.2) chaque sachet contient de quoi reconstituer 1 litre de tampon. 1 sachet (10g) + 1l d'eau = 1 litre de PBS</i> A reconstituer	2 sachets	2 sachets
Milieu de Montage <i>Flacon compte-gouttes de glycérol dilué.</i> Prêt à l'emploi	3 ml	3 ml

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipette de précision 10-15 µl
- Tubes à hémolyse et portoir ou microplaques à fond en U
- Chambre humide telle qu'une boîte de pétri contenant du papier filtre humide
- Bacs à coloration avec porte-lames
- Flacon de 1l ou éprouvette graduée
- Bécher pour le PBS
- Lamelles de verre de 24x60 mm
- Eau distillée
- Microscope à fluorescence
- Chronomètre
- Pincettes

ECHANTILLONS

- Recueillir les échantillons de sang dans des tubes secs.
- Le sérum doit être séparé du caillot aussi rapidement que possible de façon à éviter l'hémolyse.
- Les échantillons seront conservés au maximum 48 heures à +2°C/+8°C. Pour des conservations prolongées, ils seront congelés à -20°C.
- Des sérums troubles, hémolysés, contaminés ou de patients traités peuvent altérer les performances du test. Ne pas utiliser de sérums hémolysés ou lipémiques.

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les dates de péremption des lames, contrôles et conjugué sont établies pour une conservation à -20°C ou en dessous.
- Après décongélation, le conjugué et les contrôles restent stables pendant 90 jours s'ils sont conservés entre +2°C et +8°C.
- Les cycles répétés de congélation-décongélation sont dommageables pour les produits et doivent être évités.
- Le milieu de montage, conservé au réfrigérateur, est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée.
- Le PBS en poudre peut être conservé à température ambiante jusqu'à sa date de péremption.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

Les réactifs **bmd** sont uniquement destinés à une utilisation diagnostique *in vitro*.

Tous les sérums d'origine humaine utilisés dans ce coffret ont été testés à l'aide de techniques approuvées par la F.D.A. et déclarés négatifs en anticorps anti-VIH, anti-VHC ainsi qu'en antigène HBs. Néanmoins, comme aucune méthode ne peut garantir une innocuité totale, il est vivement recommandé de manipuler tous les échantillons (réactifs et spécimens) comme s'ils étaient potentiellement infectieux.

Ne jamais pipeter à la bouche.

Le conjugué, les contrôles et le milieu de montage contiennent de l'azide de sodium (< 0.1%) comme agent conservateur. Cette substance est toxique en cas d'ingestion. L'élimination des composants contenant de l'azide de sodium peut provoquer la formation d'azides métalliques explosifs avec les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Toute substitution de réactifs du coffret par d'autres peut entraîner des variations de résultats.

Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Un temps de lavage non respecté peut augmenter le bruit de fond ou altérer les cellules.

Ne pas utiliser de feutres ou marqueurs pour identifier les lames afin d'éviter d'éventuels aspects parasites.

Après décongélation de la lame, la sortir de son emballage au moment du dépôt des sérums pour éviter tout dessèchement des puits.

Ramener tous les réactifs à température ambiante pendant 15 min avant la fin de la première incubation.

PREPARATION DES REACTIFS

Avant la manipulation, ramener tous les réactifs à température ambiante.

1. Reconstitution du tampon PBS

- Dissoudre le PBS en poudre dans une bouteille d'eau distillée stérile (1 litre).
Laisser reposer 10 min avant utilisation
- Durée de conservation : 4 semaines entre +2°C et +8°C.

2. Dilution des sérums

- Diluer les échantillons au **1/10** dans le tampon PBS.
Ex : 20µl d'échantillon + 180µl de PBS
Pour les titrations, procéder à des dilutions de raison 2 : ex 1/20, 1/40 ...
- Agiter au vortex

MODE OPERATOIRE

1. Incubation des sérums

- Identifier les puits qui contiendront les contrôles positif, négatif et les dilutions sériques testées.
- Sortir la lame de son emballage, la placer dans la chambre humide.
- Déposer rapidement dans leurs puits respectifs :
 - **20 µl** d'échantillon dilué **en évitant de toucher le substrat avec l'embout de la pipette**.
 - 1 goutte de contrôle positif prêt à l'emploi,
 - 1 goutte de contrôle négatif prêt à l'emploi
- Renouveler l'opération pour la lame suivante.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.

Ne pas laisser sécher les puits des lames.

2. Lavage en tampon PBS

- Retirer les lames de la chambre humide.
- Eliminer le sérum d'un geste sec au dessus d'une poubelle pour éviter les contaminations.
- Immerger les lames plusieurs fois dans un bain de PBS frais. **Ne pas utiliser de bouteille de lavage pour rincer les lames.**
- Placer immédiatement les lames dans un portoir à lames contenant un bain de PBS frais et laisser incuber 10 minutes à température ambiante. L'agitation n'est pas nécessaire
N.B : Si plus de 10 lames sont manipulées en même temps, effectuer 2 bains de PBS de 5 minutes chacun.

⚠ Une incubation prolongée ou un lavage mal effectué peuvent affecter la morphologie du substrat et augmenter le bruit de fond fluorescent.

3. Incubation du Conjugué

- Retirer les lames une à une du portoir.
- Eliminer l'excès de PBS sur du papier absorbant.
- Sécher la lame brièvement à l'aide du buvard fourni et la remettre en chambre humide.
- Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
- S'assurer que tous les puits soient parfaitement recouverts.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante à **l'abri de la lumière directe**.

Ne pas laisser sécher les puits des lames.

4. Rinçage en tampon PBS

- Répéter l'étape 2 « Lavage en tampon PBS »

5. Montage de la lamelle

- Déposer immédiatement 3 à 4 gouttes de milieu de montage entre les puits.
- Poser une extrémité de la lamelle sur la lame puis recouvrir celle-ci progressivement pour que le milieu de montage diffuse régulièrement. Ne pas exercer de pression ou de mouvements latéraux qui peuvent endommager les substrats.

6. Lecture

Il est recommandé de lire les lames le jour du test au microscope à fluorescence à l'aide d'un objectif x10 et d'utiliser les objectifs x25 et x40 pour confirmer une fluorescence identifiée.

N.B : En cas de lecture retardée, sceller les lames avec du vernis à ongle incolore et conserver les au réfrigérateur.

CONTROLE DE QUALITE

bmd fournit dans les coffrets 48 et 96 tests :

- un contrôle positif : Ce sérum montre une image positive du kinétoplaste seul, ou kinétoplaste et noyau de *Crithidia luciliae*.
- un contrôle négatif : Ce sérum ne donne aucune réaction du kinétoplaste de *Crithidia luciliae*.

Le contrôle positif ME 0022 peut être utilisé comme contrôle de qualité externe.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Le titre d'un patient positif correspond à la dilution positive la plus élevée. Des dilutions de raison 2 seront effectuées.

Tout sérum positif doit être titré jusqu'à extinction.

Il peut arriver que certains organismes soient déformés, cela peut être due à leur stade de croissance et à leur orientation.

• Résultat positif

Le sérum du patient donne une fluorescence verte pomme au niveau du kinétoplaste ou du kinétoplaste et du noyau dès la dépiépage 1/10 et au delà.

Très spécifique du lupus, le résultat en immunofluorescence est le plus utile pour un diagnostic primaire de la maladie⁽⁸⁾.

Les anticorps dirigés contre l'ADN sont corrélés à l'activité de la maladie⁽⁶⁾. Le titre moyen observé chez les patients lupiques est 1/160 mais des titres plus élevés 1/5120 ont été rapportés⁽⁹⁾.

• Résultat négatif

Un sérum est considéré comme négatif en ADN natif sur *C.luciliae* si la fluorescence du kinétoplaste est égale ou plus faible que celle du puits du contrôle négatif.

Un sérum dont le noyau est positif avec un kinétoplaste négatif sera considéré comme négatif.

VALEUR ATTENDUE

La valeur attendue dans une population normale est négative à la dilution du screening : 1/10ème.

LIMITES DU TEST

La présence d'anticorps anti-ADN natif sur *Crithidia luciliae* est une aide précieuse au diagnostic. Des résultats positifs peuvent cependant être obtenus chez des patients sains résultant de plusieurs facteurs (ex : âge, médicaments...). Cependant, un résultat positif ne peut être utilisé seul pour poser le diagnostic. Tous les tests doivent être interprétés par un spécialiste en fonction de l'historique du patient.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES

Analyses :

Les lames d'Immunofluorescence indirecte (IIF) ont été analysées en utilisant les unités arbitraires admises pour l'intensité en microscopie de fluorescence. Les unités en décroissance d'intensité sont : 4+, 3+, 2+, 1+, +/-, -.

Reproductibilité du titre :

Quatre échantillons de serum ont été examinés sur trois lots différents avec les coffrets **bmd** en trois manipulations différentes. Toutes les valeurs positives ont été retrouvées à la même dilution finale pour chacune des trois répliques.

Echantillons normaux :

Des sérums de 743 donneurs de sang en bonne santé sans maladie auto-immune connue ont été examinés avec les coffrets *Crithidia luciliae*. Les sérums ont été dilués au 1:20. Les sérums dont la lecture au 1:20 était négative, ont été considérés comme négatifs. Aucun serum dilué au 1:20 (présentant une intensité de lecture de 1+ ou plus) n'a été identifié comme positif.

Sérums des patients présentant des désordres immunologiques diagnostiqués :

Des sérums de 1019 patients présentant plusieurs types de désordres immunologiques diagnostiqués ont été testés avec les coffrets **bmd** *Crithidia luciliae*. Les sérums ont été dilués du 1:10 au 1:320. Aucun serum dilué au 1:40 (présentant une intensité de lecture de 1+ ou plus) n'a été identifié comme positif pour A-nDNA-A.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aarden LA, DeGroot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA III
2. Ceppellini R, Polli E, Celada E. A-DNA reacting factor in serum of patients with lupus erythematosus diffusus. Proc Soc Exp Biol Med 96:572 (1957)
3. Cohen SA, et al. Character of anti-DAN antibodies in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 8:551 (1971)
4. Crowe W, Kushner I. An immunofluorescent method using *Crithidia luciliae* to detect antibodies to double-stranded DNA. Arthritis Rheum 20:811 (1977)
5. Edmonds JP, et al. The value of tests for antibodies to DNA in monitoring the clinical course of SLE. Clin Exp Immunol 22:9 (1975)
6. Gershwin ME, Steinberg AD. Qualitative characteristics of anti-DNA antibodies in lupus nephritis. Arthritis Rheum 17:947 (1974)
7. Hughes GRV, Cohen SA. Anti-DNA activity in systemic lupus erythematosus. A diagnostic and therapeutic guide. Ann Rheum Dis 30:259 (1971)
8. Slater NGP, Cameron JS, Lessof MH. The *crithidia luciliae* kinetoplast immunoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 25:480
9. Stingl G, et al. An immunofluorescence procedure for the demonstration of antibodies to native, double-stranded DNA and f circulating DNA-anti -DNA complexes. Clin Immunol Immunopathol 6:131 (1976)
10. Sennekamp J, et al. Determination of antibodies against native double-stranded DNA with an indirect immunofluorescence technique using flagellate *crithidia luciliae*. A Rheumatol 37(Suppl 5):113 (1978)










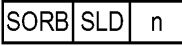






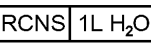
SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITE A DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
INCUBATION DES SERUMS	20 µl 1 goutte 1 goutte	Echantillons dilués Contrôle positif (prêt à l'emploi) Contrôle négatif (prêt à l'emploi)	30 mn à T.A.
<i>Renouveler l'opération pour chaque lame</i>			
LAVAGE EN TAMPON PBS	⇒ Eliminer les sérums d'un geste sec au dessus d'une poubelle pour éviter les contaminations. ⇒ Rincer brièvement la lame avec le tampon PBS. ⇒ Immerger la lame dans un bain de tampon PBS. N.B : L'agitation n'est pas nécessaire.		10 mn à T.A
<i>Eliminer l'excès de PBS à l'aide des buvards fournis (*) Pratiquer un séchage uniforme et sans frottement à l'aide d'un rouleau</i>			
INCUBATION DU CONJUGUE	1 goutte par puits	immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines (prêt à l'emploi)	30 mn à T.A. à l'abri de la lumière directe
<i>Vérifier que tous les puits sont parfaitement recouverts</i>			
RINÇAGE EN TAMPON PBS	⇒ Eliminer le conjugué d'un geste sec au dessus d'une poubelle pour éviter les contaminations. ⇒ Rincer brièvement la lame avec le tampon PBS. ⇒ Immerger la lame dans un bain de tampon PBS. N.B : L'agitation n'est pas nécessaire.		10 mn à T.A
<i>NE PAS SECHER LA LAME AVEC UN BUVARD (*)</i>			
MONTAGE	3-4 gouttes entre les puits	Milieu de Montage (prêt à l'emploi)	-
LECTURE	La lecture est réalisée au microscope à fluorescence à l'aide de l'objectif (x 10 - x 25 - x 40)		

(*) Ne pas laisser sécher les puits des lames. Chaque dépôt doit s'effectuer immédiatement.

T.A : Température Ambiante

LEGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conserver à		Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Communauté Européenne
	Lame avec "n" puits		Contrôle négatif		Milieu de montage
	Conjugué immunofluorescent		Contrôle positif		Solution de lavage
	Test en immunofluorescence indirecte				A reconstituer avec 1L d'eau distillée

BioMedical Diagnostics SA

Siège Social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com



Crithidia luciliae (IF)

REF

ME 0248

Kit



ME 0296

Kit



ME 0201

Substrat slide (4 wells)

ME 0202

Substrat slide (8 wells)

Anglais

INTENDED USE

Crithidia luciliae (IF) kit is a screening test for the semi-quantitative detection of auto-antibodies against nDNA in human serum by immunofluorescence.

DIAGNOSTIC VALUE

The initial finding that auto-antibodies against native, double-stranded deoxyribonucleic acid (nDNA) are present in sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) was made more than 40 years ago⁽²⁾.

Through the years much evidence has accumulated that auto-antibodies against nDNA are almost specific for sera of SLE patients especially with renal involvement. The specificity of anti-nDNA antibodies is much greater than that of antinuclear antibodies (ANA)⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁹⁾.

In recent years, with the availability of a well defined substrate, a simple immunofluorescence procedure has been developed for the detection of anti-nDNA antibodies⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁹⁾. It is presently being used as an aid to differentiate disease group.

PRINCIPLE OF THE TEST

Antibodies against nDNA do not exhibit species or organ specificity. The **Crithidia luciliae (IF)** kit utilizes as substrate the kinetoplast (a large mitochondrion) of *Crithidia luciliae*.

This hemoflagellate has high amounts of DNA concentrated in the kinetoplast, an organelle detectable between the nucleus and the base of the flagellum.

- First, C Luciliae substrate on microscope slides is overlaid with the diluted patient's serum and incubated to allow the anti-nDNA antibodies (A-nDNA-A) present in positive sera, to bind of the DNA.
- After a wash step, sites where A-nDNA-A (human immunoglobulins) reacted with DNA (in the kinetoplast) are made visible by the binding of fluorescently labelled anti-human antibodies (the conjugate).
- A second wash eliminates the free conjugate.
- After mounting, the slide is observed with a fluorescence microscope. A positive reaction results in a fluorescence of the kinetoplast.

REAGENTS AVAILABLE INDIVIDUALLY

ME 0201	<i>Crithidia luciliae</i> slide of 4 wells
ME 0202	<i>Crithidia luciliae</i> slide of 8 wells
ME 902.2	Fluorescent anti-IgG conjugate (2 mL)
ME 902.8	Fluorescent anti-IgG conjugate (8 mL)
ME 0022	Positive Control dsDNA (500 µL)
HME NEG	Negative control (500 µL)
HME MM	Mounting Medium buffered glycerol (3,5 mL)
HME PBS10	One-liter packet of dry PBS 10g (10 x 1L)
HME 12CS	24x60mm glass coverslips (100 units)

COMPONENTS

	ME 0248	ME 0296
Crithidia luciliae slides <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SORB</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SLD</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">n</div>	12 x 4 wells	12 x 8 wells
Positive control dsDNA <i>Dropper vial containing positive patient sample producing fluorescent staining in the kinetoplast of C.luciliae only or kinetoplast + nuclear.</i> Ready to use <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">DNA</div>	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Negative Control <i>Dropper vial containing negative patient sample.</i> Ready to use <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">-</div>	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Anti-IgG conjugate <i>Fluorescently labelled anti-human IgG globulin in phosphate buffered saline (PBS) with 1% bovine serum albumin and with evans blue.</i> Ready to use <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONJ</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">DTAF</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">IgG</div>	1 x 2 mL	2 x 2 mL
Phosphate buffer saline <i>Each PBS Powder pouch contains sufficient buffer powder to make 1 liter.(10g/pouch)</i> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">BUF</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">RCNS</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">1L H₂O</div> To dilute	2 pouch	2 pouch
Mounting Medium <i>Dropper vial containing Buffer glycerol.</i> Ready to use <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">MM</div>	3 mL	3 mL

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED I

- Volumetric pipettes to deliver 10-15 µL
- Small test tubes and rack or U-bottom microtitration plates
- Humid chambers – Petri dishes with moist filter paper
- Coplin staining jars with slide holders
- One liter volumetric flask or graduated cylinder
- Squeeze bottle for PBS
- Cover glasses #1, 24 x 60 mm.
- Distilled water
- Fluorescence microscope
- Timer
- Forceps
- Positive and negative controls

SPECIMEN COLLECTION

- Collect blood specimens in plain untreated tubes.
- After clot formation, immediately harvest the serum.
- The serum specimens may be stored in a refrigerator (2°C-8°C) for up to 48 hours. If longer storage is desired, store at -20°C.
- Turbidity, haemolysis, bacterial growth or drugs capable of fluorescing in the serum may adversely affect the performance of the test. Do not use hemolyzed or lipemic sera.

STABILITY AND STORAGE

- Expiration dates for substrates (slides), conjugate and controls are given for storage at -20°C or below.
- Once thawed the conjugate and controls are stable for 90 days when stored at +2° to +8°C.
- Repeated freezing and thawing should be avoided since it is detrimental to the products.
- The mounting medium is stable until the expiration date when stored in the refrigerator.
- The PBS powder can be stored at room temperature until its expiration date.

PRECAUTIONS

All bmd Test Kit components are for *in vitro* diagnostic use ONLY.

All human serum components have been tested by FDA approved method and found negative for antibody to HIV, HCV and non-reactive for HBsAg. However, no test method can offer complete assurance of the absence of these antigens. Care should be exercised when handling ALL human sera containing specimens.
Avoid mouth pipetting.

All controls, conjugate and mounting medium contain sodium azide as preservative in concentration 1:1,000. This preservative is toxic if ingested. In addition, sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive azides. On disposal of sodium azide containing solutions, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

Do not substituted others reagent's manufacturers.

Do not use components or reagents beyond their expiration dates. Extended incubation during the wash step or improper washing may result in poor morphology of substrate and increased background fluorescence.

Avoid using pen to identify the slide

Remove slides from freezer and allow them to reach room temperature – **Don't remove from protective envelopes before use.**

Use each slide immediately after opening the envelope to avoid damaging the substrate by drying.

All reagents must be at room temperature before use (at least 15 mn)

SET-UP

All reagents must be at room temperature before use.

1. Preparation of the wash and dilution buffer

- Reconstitute buffer pack with one liter distilled water.
Wait 10 mn before use
- Storage period : 4 weeks at +2°C/+8°C

2. Sera dilution

- Dilute freshly collected and properly stored patient serum 1:10 in PBS.
Ex : 20µL serum + 180µL PBS
For titrations, set up doubling dilutions (i.e 1/20, 1/40 ...)
- Mix with vortex

TEST PROCEDURE

1. Incubation of samples

- Identify wells which are going to contain positive and negative control sera and patient's serum dilutions.
- Remove slide from protective envelopes and put on the humid chamber
- In the identified well of the slide, add
 - **20µL sample by avoiding to touch the substrate with the tip of the pipette.**
 - 1 drop of positive control ready to use
 - 1 drop of negative control ready to use
- Do the same with each slide.
- Incubate for 30 minutes at room temperature.

Do not let the well dry out

2. Wash with PBS

- Remove slides from humid chamber.
- Tap each slide quickly on its side to avoid contaminations.
- Dip the slides several times in a beaker containing fresh PBS. **Do not use wash bottle to rinse the slides.**
- Immediately place slides in a slide holder or a coplin jar and wash with PBS and incubate for 10 minutes at room temperature. Agitation is advised but not useful.
Note: If more than 10 slides are tested, wash two time in PBS bath (5 minutes each).

⚠ Extended incubation and improper washing may result in poor morphology of substrate and increased background fluorescence.

3. Incubation of Conjugate

- Remove the slide from PBS
- Eliminate excess of PBS on Teflon with the blotter
- Immediately apply 1 drop of conjugate to each well to cover substrates
- Incubate for 30 minutes at room temperature and **far from light.**

Do not let the wells dry out

4. PBS rinse

- Repeat Step 2 "Wash with PBS".

5. Mount Cover glasses

- Apply 3 or 4 drops mounting medium to each slide.
- Cover with cover glasses – Lateral movement and pressure will damage the substrate

6. Reading

It is recommended to examine the day of the test with an appropriately equipped fluorescence microscope (x10) and use microscopes (x25 or x40) to confirm a positive fluorescence.

Note: If delay in examining slides is anticipated, seal coverglass with clear nail polish and store in refrigerator.

QUALITY CONTROL

Inside the kit of 48 and 96 tests, [bmd](#) provide:

- 1 positive control: Positive patient sample producing fluorescent staining in the kinetoplast of *C. luciliae* only or kinetoplast + nuclear.
- 1 negative control: patient sample producing no fluorescent staining pattern in the kinetoplast of *C. luciliae*.

ME 0022 Positive control can be used as external quality control.

INTERPRETATION OF RESULTS

The end point is the highest dilution that produces a positive result.

All positive sera should be titrated to the highest titre using a series of doubling dilutions.

Read only single well defined organism in each field. Some of the organisms will look deformed, due to their stage of growth and orientation on the viewing interference.

• Positive result

Patient's sera giving bright apple green appearance of the kinetoplast alone or the kinetoplast and the nucleus of dilutions 1:10 and higher are considered positive. Being highly specific for SLE, the immunofluorescence test is most useful in primary diagnosis of this disease⁽⁸⁾. Antibodies to native DNA are thought to correlate with clinical activity of the disease⁽⁶⁾. Mean titre of SLE patients is 1:160 but titres as high as 5,120 have been reported⁽⁹⁾.

• Negative result

No fluorescence on the kinetoplast whatever the fluorescence of the nuclear or the flagella.

EXPECTED VALUES

Normal population is negative with the screening dilution 1/10e

LIMITATIONS OF THE TEST

The *Crithidia luciliae* kit is a valuable diagnostic aid. However, it should not be considered diagnostic by itself only. Positive nDNA test results may be obtained with sera of healthy people as a result of many factors (e.g. age, drug treatment, etc). Therefore, all nDNA test results should be interpreted by a medical authority in light of all known patient's conditions.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Assay units:

Indirect immunofluorescence (IIF) was assayed using accepted arbitrary units of intensity under fluorescence microscopy. The units from greatest to least intensity are; 4+, 3+, 2+, 1+, +/-, -.

Titer reproducibility:

Four serum samples were tested on three different lot numbers of [bmd](#) kits on three different occasions. All positive values titered to negative at the same dilution for each of the three replicates.

Normal samples:

Sera from 743 healthy blood donors with no history of autoimmune disease were tested on [bmd](#) Crithidia luciliae kits. Sera were diluted 1:20. A negative reading at 1:20 was considered negative. No positive readings of 1+ or higher at dilutions of 1:20 or greater were scored as positive. No sera of health subjects is reported as positive with [bmd](#) Crithidia luciliae kit.

Sera from patients with diagnosed disorders:

Sera from 1019 patients with variety of diagnosed disorders were tested with [bmd](#) Crithidia luciliae kits. Sera were diluted from 1:10 to 1:320. No positive readings of 1+ or higher at dilutions of 1:40 were scored as positive for A-nDNA-A.

REFERENCES

1. Aarden LA, DeGroot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA III
2. Ceppellini R, Polli E, Celada E. A-DNA reacting factor in serum of patients with lupus erythematosus diffusus. Proc Soc Exp Biol Med 96:572 (1957)
3. Cohen SA, et al. Character of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 8:551 (1971)
4. Crowe W, Kushner I. An immunofluorescent method using Crithidia luciliae to detect antibodies to double-stranded DNA. Arthritis Rheum 20:811 (1977)
5. Edmonds JP, et al. The value of tests for antibodies to DNA in monitoring the clinical course of SLE. Clin Exp Immunol 22:9 (1975)
6. Gershwin ME, Steinberg AD. Qualitative characteristics of anti-DNA antibodies in lupus nephritis. Arthritis Rheum 17:947 (1974)
7. Hughes GRV, Cohen SA. Anti-DNA activity in systemic lupus erythematosus. A diagnostic and therapeutic guide. Ann Rheum Dis 30:259 (1971)
8. Slater NGP, Cameron JS, Lessof MH. The crithidia luciliae kinetoplast immunoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 25:480
9. Stingl G, et al. An immunofluorescence procedure for the demonstration of antibodies to native, double-stranded DNA and of circulating DNA-anti-DNA complexes. Clin Immunol Immunopathol 6:131 (1976)
10. Sennekamp J, et al. Determination of antibodies against native double-stranded DNA with an indirect immunofluorescence technique using flagellate crithidia luciliae. A Rheumatol 37(Suppl 5):113 (1978)










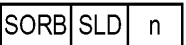




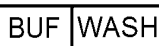

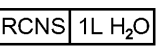
SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
INCUBATION OF SAMPLES	20 µL 1 drop 1 drop	Diluted samples Positive control (ready to use) Negative control (ready to use)	30 mn at R.T
<i>Do the same with each slide</i>			
PBS WASH	⇒ Tap each slide quickly on its side to avoid contaminations ⇒ Dip the slide several times in a beaker containing fresh PBS ⇒ Place slides in a slide holder or a coplin jar and wash with PBS. ⇒ N.B : Agitation is not useful.		10 mn at R.T
<i>Eliminate excess of PBS with the blotters provided (*) – Dry uniformly and without friction using a roller</i>			
INCUBATION OF CONJUGATE	1 drop to each well	Fluorescein conjugated Affinipure Goat anti-human IgG (ready to use)	30 mn at R.T in the dark
<i>Verify that all wells are perfectly covered</i>			
PBS RINSE	⇒ Tap quickly each slide on its side to eliminate the conjugate. ⇒ Dip the slide several times in a beaker containing fresh PBS. ⇒ Place slides in a slide holder or a coplin jar and wash with PBS. N.B : Agitation is not useful.		10 mn at R.T
<i>DO NOT ELIMINATE EXCESS OF PBS (Teflon) (*)</i>			
MOUNT COVER GLASSES	3-4 drops to each slide	Mounting Medium (ready to use)	-
READING	Examine with an appropriately equipped fluorescence microscope (x 10 – x 25 - x 40).		

(*) **Do not let wells dry out.** Every deposit must be made at once.

R.T : Room Temperature

SYMBOLS USED

	Biological risks		Temperature limitation		Catalogue Number
	Consult instructions for use		In Vitro Diagnostic Medical Device		Batch Code
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Slide with "n" wells		Negative control		Mounting Medium
	Fluorescent antibody conjugate		Positive control		Wash Buffer
	Immunofluorescent assay				Reconstitute with 1L distilled water

BioMédical Diagnostics SA

Office
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66



E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com