

 SØRLANDET SYKEHUS		Medisinsk serviceklinikk		Prosedyre
Antistoff rettet mot dsDNA. Screening og titrering. Enhet for immunologi. ImTra SSK.				Side 1 av 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-3	Godkjent dato: 14.01.2025	Gyldig til: 14.01.2027	Dato endret: 14.01.2025	Revisjon: 6.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

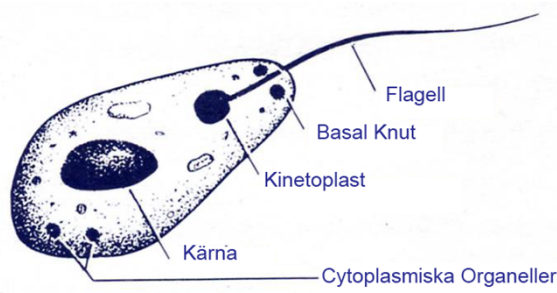
DISTRIBUSJONSliste: EK.

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Forlenget gyldighet til 14.01.2027 uten endringer i dokumentet.

HENSIKT/BAKGRUNN
Indirekte fluorescensteknikk (IIF) for påvisning av IgG-antistoff mot dsDNA (dobbeltrådet DNA) i humanserum. Testen skal være relativt spesifikk for systemisk lupus erythematosus (SLE). Testen benyttes som en videreutredning av prøver funnet positive på dsDNA med multiplex-teknikk.

OMFANG
Bioingeniører og leger ved Enhet for immunologi.

AKKREDITERT ANALYSE	TATT I BRUK
Nei	Har hatt metoden siden før 1996, men mulig vi har skiftet leverandør en gang.

ANALYSEPRINSIPP
Antistoff mot dsDNA detekteres ved farging av kinetoplasten i organismen Crithidia luciliae. C. luciliae er en flagellat som snylter på spyflue. Kinetoplasten finnes i mitokondriet og består av dsDNA. Kinetoplasten befinner seg mellom kjernen, som er sentralt plassert, og flagellens basale knute.  Fortynnet pasientserum inkuberes med antigensubstrat som er fiksert i brønner på objektglass. Hvis pasientserumet har anti-dsDNA, vil disse bindes til dsDNA i kinetoplastene. Alt ubundet serumprotein blir fjernet ved vask. Reaksjonen gjøres synlig ved å tilsette konjugat, som er anti-humant IgG fra geit merket med fluorescein. Konjugatet binder seg til antistoffet som er bundet til antigenet. Ubundet konjugat vaskes bort. Komplekset er synlig i fluorescensmikroskop. Ved positivt funn foretas titrering.

LIS (lab-data system)
LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi. ImTra SSK.
Navn og Unilab koder: Anti-DNA = sDNA og sDNA (titer) Arbeidsliste/restliste: 404/DNA

METODENS YTELSE
Måleområde Kvalitativt (= positiv eller negativ) eller semikvantitativt (= titer). Utgis som negativ eller titerverdi opp til > 2560.

Dokumentet skal verifiseres av medisinsk ansvarlig overlege.

DokumentID: D03118

Utarbeidet av: Kristine Thomassen Bergt Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Bergt Enhetsleder	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Verifisert av: 10.02.2023 - Kvalitetskoordinator Kari - Ann Nedal
---	---	--	---

 SØRLANDET SYKEHUS		Antistoff rettet mot dsDNA. Screening og titrering. Enhet for immunologi. ImTra SSK.			Side: 2 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-3	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 14.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 6.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

Interferens/ kryssreaksjoner og andre feilkilder	La serumprøvene og reagenser oppnå romtemperatur før testing. Unngå å bruke sera som utviser høy grad av lipemi, hemolyse eller mikrobiell vekst, da dette kan føre til økt bakgrunnsfluorescens, titerreduksjon og/eller uklare fargemønstre. Forekomst av overdraging skal alltid vurderes. (Bør mistenkes ved to identiske positive funn etter hverandre, spesielt om det i en av brønnene kun er positivt utslag i områder nærmest den andre brønnen med positivt utslag.) Antigenoverskudd: mistenkes ved negativ prøve når forrige prøve på samme pasient er positiv.
Usikkerhets vurdering	Brønner skal ikke tørke ut, da det kan føre til høyt nivå av bakgrunns fluorescens og falskt positivt resultat. Ikke ta på snittene. Røff behandling av slide kan føre til ødelagte snitt.

PRØVEMATERIALE	
Prøvemateriale	Avpipettert serum
Prøvemengde	10 µl til en 1:10 fortynning.
Prøvebehandling	Oppbevares ved 2-8 °C i inntil 7 dager. Kan fryses i -20 °C fryser om prøvene vil bli eldre enn 7 dager før analysing. Serum som har vært frosset og tint mer enn én gang, kan ikke benyttes til analysing.

REAGENSER	
Leverandør	Triolab AS leverer kit fra ImmunoConcepts.
Reagenser	Se oversikt over reagenser under arkfanen Triolab AS: O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for IMM-TRA SSK\ImTra\A immunologi\Innkjøp av reagens\Plan for innkjøp av reagens fordelt på leverandører.xlsx IgG anti-nDNA Crithidia luciliae. Objektglass med 7 brønner. Anti-humant IgG fra geit merket med fluorescein isothiocyanate (FITC). Positiv kontroll klar til bruk. Titrerbar kontroll i kit fortynnes 1:10 i PBS, dvs. behandles som pasientprøve. Negativ kontroll klar til bruk.
Mottak av reagens	Følg enhetens rutiner Bestilling og mottak av reagenser, engangsutstyr og kritiske materialer, ImTra SSK.
Pakningsvedlegg	Det kontrolleres en gang i året at vi følger siste versjon av pakningsvedlegg. Loggføring av versjoner på pakningsvedlegg i bruk. Enhet for Immunologi. ImTra SSK.
Oppbevaring	Kit i bruk oppbevares i kjøleskap ved Enhet for immunologi. Nye objektglass og reagenser oppbevares i kjølerom ved 2-8 °C ved Enhet for immunologi.
Tillaging(med holdbarhet)	Vaskebuffer PBS pulver, pH 7,4 ± 0,2. Lages på substratkjøkkenet, Mikrobiologisk avd. Holdbar i 4 uker. Når vi får nylaget PBS til oss, skal vi fordele noe over i en ny mindre kolbe og i en ny spruteflaske.
Forholdsregler	Alle prøver, biologiske reagenser og materialer som brukes i analysen må betraktes som mulig smittefarlige stoffer. Unngå kontakt med hud, øyne og slimhinner. Benytt hansker. Noen reagenser i dette kitet inneholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- eller kopperrør og danne svært eksplosive metallazider. Ved avhending må det skylles ned med mye vann for å forebygge oppbygging av azid.

UTSTYR OG KALIBRERING	
	Hamilton diluter benyttes for fortynning av prøver. Denne kalibreres etter prosedyren Kontroll av Hamilton diluter, Enhet for immunologi, ImTra SSK. Annet nødvendig utstyr:

 SØRLANDET SYKEHUS		Antistoff rettet mot dsDNA. Screening og titrering. Enhet for immunologi. ImTra SSK.			Side: 3 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-3	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 14.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 6.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

	Pipetter, fuktkammer, skylleflaske med PBS, 1000 µL glassbeger, magnetrører, magnet, objektglassholder, pappmappe, linsepapir og dekkglass, fluorescensmikroskop, engangshansker og cellostøff.
Rutine ved lotskifte	Ny lot av objektglass kontrolleres ved å sette opp en titerrekke med ny og gammel lot i samme oppsett. Kontroller kan brukes, men da disse gir ganske lav titer verdi, kan det være bedre å benytte tidligere positive pasientprøver med titer 80-640. Kommenter at du har utført kontroll av ny lot i kommentarfeltet på «ny lot» lappen som følger med nytt kit. Dater og signer. Verdiene legges inn i eget Excel ark.

KVALITETSKONTROLL	
Kontrollmateriale	Positiv og negativ kontroll fra kitet brukes. I tillegg har vi med PBS som blank. Laboratoriet er i tillegg med i SLP-program for alle aktuelle analyser.
Rutine ved lotskifte av kontroller	Ved oppsett som inneholder ny lot av kontroller, vurderes kontrollen for utslag, som del av vanlig rutine ved avlesning av kontroller. Positiv kontroll skal vise tydelig fluorescens i kinetoplasten. Negativ kontroll skal ikke ha fluorescens i kinetoplasten.

FORBEREDELSE	
	Alle reagenser (objektglass, konjugat, kontroller, PBS) skal ha romtemperatur før bruk. La reagensene stå framme på benk i 20-30 minutter. Fyll opp det som trengs av PBS til fortynning og vask.
Lag arbeidsliste:	Kontroller restliste og lag ny arbeidsliste i Unilab-700 (nr 404). Skriv ut arbeidslisten. Se Unilab prosedyren for framgangsmåte.
Lag oppsettskjema:	Noter posisjon av prøver og ev. titreringsrekker av prøver på skjema: A-dsDNA oppsettmal. Enhet for immunologi, ImTra SSK Ikke kjør med tomme brønner. La ev. prøven vente til neste oppsett, så lenge det ikke haster eller prøven er gammel. En positiv kontroll skal være med på hvert objektglass. Her kan positiv ferdig fortynnet kontroll, eller den titrerbare, benyttes (fortynnes som pasientprøve). En negativ kontroll skal være med i oppsettet. Har man flere objektglass skal også PBS-kontroll være med i oppsettet.
Fortynn pasientprøver:	Lag utgangsfortynning av pasientserum 1: 10 med PBS. Bruk Hamilton diluter, Program 1-10 DNA. Hamilton Diluter. Enhet for immunologi, ImTra SSK. Bruk TT-rør til fortynningene. Merk glassene. Prøver som har vært screenet og funnet positive, skal titreres fra utgangsfortynning. Det skal fortynnes trinnsvis x 4 dvs. 1:10 (utgangsfortynning), 1:40, 1:160 og 1:640. Bruk Program 1-4 Titer på Hamilton diluter. Bland rørene mellom hvert trinn.
Vedlikehold:	Rent beger til PBS-vask hver uke. Rens mikroskopets linser og plattform med aceton ved behov.

UTFØRELSE	
1. Ta frem tilstrekkelig antall objektglass og reagens og vent til temperaturen er utjevnet til romtemperatur. Ta dem ut av omslaget uten å skade snittene, og merk hvert glass med nummer og dato. 2. Legg objektglasset i fuktkammer tilsatt dest.vann.	

 SØRLANDET SYKEHUS	Antistoff rettet mot dsDNA. Screening og titrering. Enhet for immunologi. ImTra SSK.				Side: 4 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-3	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 14.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 6.05

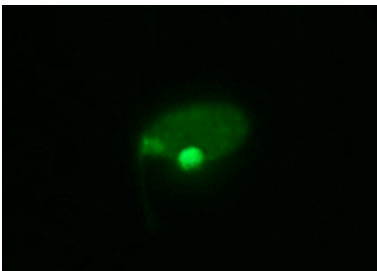
Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

3. Tilsett en dråpe av hver kontroll i oppsettets standardposisjoner som tidligere beskrevet. Dekk hele snittet uten å komme i direkte kontakt med det.
4. Følg oppsettsmalen for plassering av prøvene på objektglassene, og tilsett ca 25 µl fortynnet pasientserum og ev. titreringer i de riktige brønnene. Dekk vevssnittene fullstendig. **Fra dette punktet i prosedyren må vevssubstratet holdes vått.**
5. Dekk til fuktkammeret og inkuber objektglassene ved romtemperatur i 30 minutter.
6. Bruk spruteflaske og spyl forsiktig bort serumet med en tynn stråle PBS. Hold objektglasset litt på skrå og **spyl aldri direkte på snittet**. Spyl heller langs toppkanten av glasset, slik at serum renner rett ned i vasken, og ikke krysskontaminerer sidebrønnen. Plasser objektglasset i holderen. Sett holderen umiddelbart videre over i et begerglass fylt med PBS og magnet i bunnen. Sett begerglasset på magnetrøreren, og vask i 10 minutter med røring på 450 – 500rpm.
7. Utføres på et objektglass av gangen (for å unngå uttørking): **Dypp objektglasset 3-5 ganger i destillert vann.** Dunk objektglasset lett på cellostoff for å fjerne overskudd av PBS, og tørk forsiktig av langs kanten og på baksiden av glasset. Legg glasset i fuktkammeret, og tilsett en dråpe konjugat til brønnene.
8. Inkuber objektglassene i et tildekket fuktkammer ved romtemperatur i 30 minutter. Bruk et svart lokk for å beskytte mot unødig lys.
9. Spyl og vask med PBS som før, i 10 minutter med røring på 450 – 500 rpm.
10. Utføres på et objektglass av gangen (for å unngå uttørking): **Dypp objektglasset 3-5 ganger i destillert vann.** Dunk objektglasset lett på cellostoff for å fjerne overskudd av PBS og tørk forsiktig av langs kanten og på baksiden av glasset. Legg det i den aktuelle pappmappen (merket med ukedag) og tilsett en liten dråpe monteringsbuffer på kanten av brønnene. **Heller for lite enn for mye!** Sett forsiktig på dekkglass uten å bruke trykk. Unngå bobler mellom preparat og dekkglass. Oppbevar pappmappen i kjøleskap frem til avlesning.
11. Slå på fluorescensmikroskopet og vent 5 min. til mikroskopet er oppvarmet, før avlesning. Lampen har 200 timers holdbarhet, og skal derfor ikke stå på unødvendig.
Gi beskjed til Med.Tekn. via Merida med en gang lampen overstiger 200 timer. Telletallet er synlig i displayet til strømforsyneren.
12. Avles fluorescens. Noter ev. fluorescensmønster og titerverdier på arbeidslisten.
13. Avlesningen skal kontrolleres av en annen bioingeniør som benytter oppsettskjemaet for utfylling av utslag. Ved tvil skal utslag kontrolleres av enhetsleder ved Enhet for immunologi, ev. lege. I perioder med ferie/sykdom, der det ikke er tilstrekkelig opplært personell til stede, kan en avvike fra dette.

VURDERING AV ANALYSERESULTATER	
Vurdering av kontroller	Kontrollene må undersøkes før pasientprøvene avleses. Kontrollresultatene må gi de korrekte positive og negative reaksjonene for å validere prosedyreresultatene. Dersom kontrollene ikke gir forventet resultat, skal pasienttestresultatene ikke rapporteres. Gjenta testprosedyren.
Vurdering av prøvesvar	Reaksjonene skal vurderes på linse 40x. Anti-dsDNA: Negativt: Et serum betraktes som negativt for anti-dsDNA om kinetoplastfluorescensen er svakere enn eller lik den negative kontrollen. Nukleær farging, uten kinetoplastfarging, betraktes også som negativt for anti-dsDNA. Farging av kjernen, basalknuten eller flagellen er negativt bilde. Se bildeillustrasjoner: 

 SØRLANDET SYKEHUS	Antistoff rettet mot dsDNA. Screening og titrering. Enhet for immunologi. ImTra SSK.				Side: 5 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-3	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 14.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 6.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

	Positivt: Et serum betraktes som positivt om kinetoplasten viser en klar, jevn farging med en fluorescens sterkere enn bakgrunnen. Se bildeillustrasjon:  Antistofftiter: Begynn med å lese av den høyeste fortynningen og les baklengs fram til fortynning 1:10. Den første brønnen med en klar, jevn kinetoplastfarging er titerverdien. Vi kan gi ut titerverdi mellom to brønner (for eksempel 20, 80), dersom det er sterkt utslag ved én titerverdi (så sterkt at det gir forventet utslag ved neste titerverdi) og negativt bilde i neste brønn.
Spesielle vurderinger	Antigenoverskudd: ved mistanke om dette legges det inn en kommentar i Unilab. Denne vil vises på arbeidslisten neste gang det rekvireres prøve på samme pasient. Velg: <i>Rekvirering- Pasient administrasjon</i>. Trykk på <i>Commenting</i>. Legg inn tekst: "Mulig antigenoverskudd – titreres i første oppsett" i kommentarfeltet, og trykk <i>tab</i> slik at det blir grønt. Dersom tidligere titer var høyere enn 640, må prøven fortynnes videre til titer 2560. Her kan det vurderes ikke å ta med de laveste fortynningene.

SVARRAPPORTERING	
Referanseområde	Anti dsDNA titer >20: positiv Anti dsDNA titer 10-20: grenseverdi
Benevning	Kvalitativt (= positiv eller negativ) eller semikvantitativt (= titer).
Antall desimaler	0
Registrering	I Unilab: Velg <i>Validering</i> og <i>Teknisk validering</i>; <i>arbeidsplass nr: 404</i>, legg inn svar og lagre. Svar registreres som "—" eller "pos" for screening. Ved usikker avlesning legges svar inn først når titrering er utført. Svar som det legges inn positivt utslag på, blir automatisk etterbestilt for titrering ved lagring. Titerverdi legges inn der titrering er utført. Standardkommentaren: «Se Laboratoriehåndboka (https://sshf.labfag.no) for tolkning av analyseresultat.» legges automatisk til som egen analyse ved patologiske resultater. Standardkommentaren: «Grenseverdi» legges automatisk til rapportering av titer 10 og 20. Sett positive screeningprøver tilbake i analysestativ. Referansekommentarer blir plukket opp av Unilab. Sjekk om dagens prøvesvar er plausible sammenliknet med tidligere resultat, der det finnes. Vurder tidsrommet mellom resultatene og om det kan være plausible forklaringer på nivåendringen (kliniske opplysninger?) Ved tvil konsulter enhetsleder/ fagbioingeniør/ lege. Den som legger inn resultat, skal skrive ut arbeidsliste. Velg <i>Rapportering</i>, <i>arbeidsplass nr: 404</i>, merk <i>listekopi</i>, og trykk <i>OK</i>.

 SØRLANDET SYKEHUS		Antistoff rettet mot dsDNA. Screening og titrering. Enhet for immunologi. ImTra SSK.			Side: 6 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-3	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 14.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 6.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

Teknisk validering	Arbeidslister med resultater skal kontrolleres av en annen bioingeniør, og frigjøres. Velg <i>Validering</i> og <i>Teknisk validering</i> ; <i>arbeidsplass nr: 404</i> , velg <i>sperrede resultater</i> , trykk <i>OK</i> . Velg <i>Merk alle</i> og <i>friggi alle</i> . Signer for kontrolleringen på arbeidslisten sammen med signatur fra utfører. Arkiver signert arbeidsliste i arbeidsperm på hyllen i stillerommet, Enhet for immunologi.
Medisinsk validering	De fleste patologiske prøveresultater på analyser utført ved Enhet for immunologi skal valideres av lege ved ImTra før de frigis til rekvirentene. Ved fravær av lege kan spesielt opplærte bioingeniører ved Enhet for immunologi friggi resultatene i påvente av medisinsk validering. Rutiner er beskrevet i Medisinsk validering og frigivning av immunologi-resultater i Unilab. ImTra SSK.

OPPBEVARING AV PRØVEMATERIALE ETTER ANALYSERING Prøver med positivt utslag skal settes i analysestativet til titrering. Alle prøvene skal arkiveres i minst ett år i -20 °C fryseskap på Enhet for immunologi. Se egen prosedyre.
--

AVFALLSHÅNDTERING Fortynningsrør, objektglass kastes i gul dunk. Forbruksmateriell som har lite blodsøl/en dråpe, kastes i vanlig søppel. Prøverør med ID kastes i gul dunk. Glass/plast med kroppsvæsker skal kastes som risikoavfall. All plast skal kastes i plastavfall. Blå plastbeholder til alt papir som inneholder pasientdata, ellers alt annet papir i grønn beholder. Ved behandling av prøver og reagenser som er i kontakt med prøver, skal hansker benyttes for å unngå ev. smitte. Ved behov; se Stoffkartoteket.

Dokumentasjon:

Pakningsvedlegg: O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for IMM-TRA SSK\ImTra\A_ immunologi\Pakningsvedlegg

Utførte verifiseringsrapporter i senere tid:

O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for IMM-TRA SSK\ImTra\A_ immunologi\Validering\2009\Rapport DNA nytt fluorecent antibody reagent 191009.doc

Kryssreferanser

II.MSK.ImTra.2.a.3-1	Bestilling og mottak av reagenser, engangsutstyr og kritiske materialer, ImTra SSK.
II.MSK.ImTra.2.g.3.2-2	A-dsDNA oppsettmal. Enhet for immunologi, ImTra SSK
II.MSK.ImTra.2.g.3.3-2	Hamilton Diluter. Enhet for immunologi, ImTra SSK.
II.MSK.ImTra.2.g.3.3-3	Kontroll av Hamilton diluter, Enhet for immunologi, ImTra SSK.
II.MSK.ImTra.2.g.4-4	Medisinsk validering og frigivning av immunologi-resultater i Unilab. ImTra SSK.
II.MSK.ImTra.2.g.4-5	LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi. ImTra SSK.
II.MSK.ImTra.2.g.4-13	Loggføring av versjoner på pakningsvedlegg i bruk. Enhet for Immunologi. ImTra SSK.