



Anti-dsDNA Antibody ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

CLIA Complexity: High
 CDC Analyte Identification Code: 0425
 CDC Test System Identification Code: 28276

REF 1120 Anti-double stranded DNA antibodies (dsDNA) 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunoassay (ELISA) for the detection and quantitation of IgG antibodies to double stranded DNA (dsDNA) in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA) are found in various autoimmune diseases. ANA's include antibodies to antigens of the nucleus such as to DNA, histone and various extractable nuclear antigens such as RNP, Sm, SS-A and SS-B. Three specificities occur with anti-DNA antibodies.

These include:

1. anti-dsDNA antibodies that react only with dsDNA
2. anti-ssDNA antibodies that react with ssDNA
3. anti-ds/ssDNA antibodies that react with both dsDNA and ssDNA.

Of these three types, anti-dsDNA antibodies are characteristic of systemic lupus erythematosus (SLE). They rarely occur in other autoimmune disorders¹⁻⁶. The frequency and levels of these antibodies fluctuate with disease activity occurring overall in about 50-55% of SLE cases and in about 89% of SLE patients with active renal disease³⁻⁷. Antibodies to dsDNA may disappear with immunosuppressive treatment and during remission. There is a good correlation between disease activity and anti-dsDNA antibody levels⁸. The ImmuLisa™ Anti-dsDNA Antibody ELISA assay detects and quantitates dsDNA antibodies of the IgG class. Anti-DNA antibodies of IgM and IgA isotypes also occur, but IgG class antibodies have been shown to be clinically relevant³. The results are reported in International Units (IU)/ml. Both the calibrator and positive control have been calibrated with respect to the World Health Organization (WHO) Reference Reagent Wo/80⁹.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

The test is performed as a solid phase enzyme labeled immunosorbent assay (ELISA). Microwells are coated with purified dsDNA antigen and the unreacted sites are blocked to reduce nonspecific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows specific anti-dsDNA antibodies present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the wells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in International Units per milliliter (IU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water.

Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁰.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practises to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

Materials provided

Immulin™ dsDNA Antibody ELISA **REF** 1120









Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Microplate with individual breakaway microwells coated with dsDNA antigen
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to dsDNA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + dsDNA *	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for dsDNA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>whitecap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains <0.1% NaN₃

EN

Symbols used on labels:

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week.. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

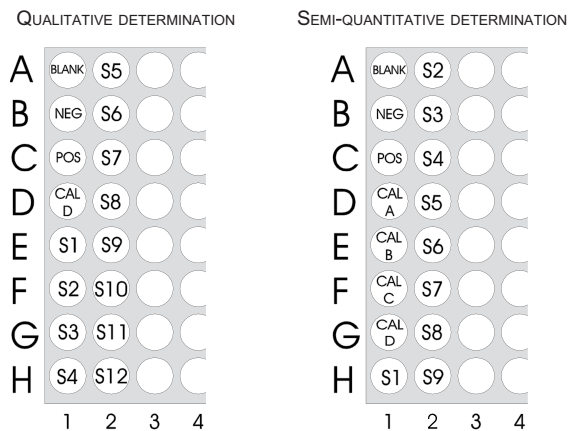
- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.

EN

- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*). **or** For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.

EN

Step 15 Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, standardized against the World Health Organization (WHO) Reference Reagent Wo/80, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3.

Qualitative Determination

- The Positive Control should be greater than the value [IU/ml] of Calibrator D
- The optical density of Calibrator D must be greater than that of the Negative Control and less than the absorbance of the Positive Control.

Semi-Quantitative Determination

- Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated.
- The Negative Control must be less than 60 IU/ml
- If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining IU/ml
- The Positive Control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

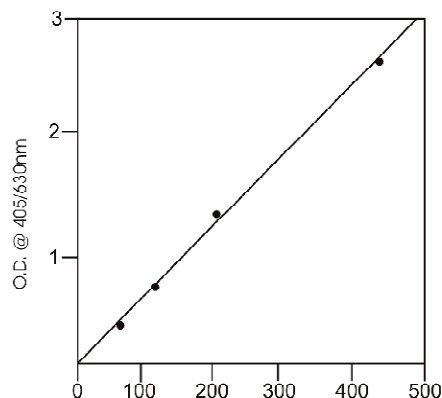
1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{IU/ml of Calibrator D} = \text{IU/ml Test Sample}$$

Determine approximate IU/ml of the patient sample using the calculation above. Patients should only be screened as positive or negative using the qualitative mode of calculation. Samples found positive using this method should be evaluated again using the semi-quantitative method, below, for accurate determination of antibody levels.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in IU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Typically, a linear regression is obtained and recommended. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.



Calibrator

The Ready to Use Calibrators [A - D] are included to provide accurate quantitative values [IU/ml] for patient samples and must be used in each run. Calibrator D is provided for qualitative determinations to screen patients as positive or negative only. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining IU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results using both qualitative or quantitative determinations. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

Anti-dsDNA value	Interpretation
< 50 IU/ml	Negative
50-60 IU/ml	Indeterminate (Borderline)
> 60 IU/ml	Positive

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.

The assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. When the results of testing are borderline, further testing for the following is suggested:

- Antinuclear Antibodies - HEp-2 cells
- Antinuclear Antibodies - Mouse Kidney or Mouse Liver tissue sections
- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- *n*DNA by indirect immunofluorescence

Above tests are available from Immco Diagnostics Inc., please refer to Product Catalog.

Testing for complement levels C3 and C4, CH50 and immune complexes is also suggested. Strong positive results are indicative of SLE. However, negative results can not necessarily rule out a diagnosis of SLE. When there is a high suspicion of SLE, then other tests, such as for ANA's anti-ENA's, anti-*n*DNA's by immunofluorescence and complement levels should also be considered. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as diagnostic in themselves.

EXPECTED VALUES

Incidence of Anti-dsDNA Antibodies

Disease	Incidence %
Systemic Lupus Erythematosus	50-55
active renal disease	89
active non-renal disease	56
inactive disease	30
Possible SLE	32
Rheumatoid Arthritis	0
Systemic Scleroderma	0
Normal patients	0

Note: The frequency of dsDNA antibodies listed above represent compilation from the literature^{3,7}. The incidence varies depending upon the patient population.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmuLisa™ anti-*dsDNA* Antibody Test was compared with a commercially available indirect immunofluorescence test kit for the detection of antibodies to *dsDNA* in human serum.

A total of 57 sera were obtained from a clinical reference laboratory. They were identified as positive or negative for anti-*dsDNA* antibodies by indirect immunofluorescence and were tested according to the procedures recommended by the manufacturer. The results are summarized in the following Table:

Comparison of ImmuLisa™ *dsDNA* to Indirect Immunofluorescence IF *dsDNA* Antibody Kit

		ImmuLisa™		
		Positive	Negative	Total
OTHER	Positive	15	4	19
	Negative	3	35	38
	Total	18	39	57

Agreement: 88%
Sensitivity: 83%
Specificity: 92%

Precision:

Two *dsDNA* positive sera were tested with the ImmuLisa™ *dsDNA* ELISA to determine inter-and intra-assay variability. The results are as follows:

	inter-assay	intra-assay
	%CV	%CV
Sample 1	5.2	4.4
Sample 2	3.4	10.9

Recovery:

Samples with known *dsDNA* concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of *dsDNA*. *dsDNA* levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results are as follows:

	dsDNA conc. added (IU/ml)	dsDNA conc. obtained (IU/ml)	% Recovery
Sample 1	178.5	192.9	108.1
Sample 2	148.5	152.5	102.7
Sample 3	89.0	88.1	99.0



Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1120 Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσοροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG κατά του δίκλωνου DNA (*dsDNA*) σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) ανιχνεύονται σε διάφορες αυτοάνοσες νόσους. Τα ANA περιλαμβάνουν αντισώματα κατά αντιγόνων του πυρήνα, όπως το DNA, οι ιστόνες και διάφορα εκχυλιζόμενα πυρηνικά αντιγόνα, όπως το RNP, το Sm, το SS-A και το SS-B. Στα αντι-DNA αντισώματα εμφανίζονται τρεις ειδικότητες.

Αυτές περιλαμβάνουν:

1. αντισώματα αντι-*dsDNA* που αντιδρούν μόνο με *dsDNA*
2. αντισώματα αντι-*ssDNA* που αντιδρούν μόνο με *ssDNA* (μονόκλωνο DNA)
3. αντισώματα αντι-*ds/ssDNA* που αντιδρούν τόσο με *dsDNA* όσο και με *ssDNA*.

Από αυτούς τους τρεις τύπους, τα αντισώματα αντι-*dsDNA* χαρακτηρίζουν το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ). Εμφανίζονται σπάνια σε άλλες αυτοάνοσες νόσους¹⁻⁶. Η συχνότητα και τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων κυμαίνονται, ανάλογα με τη δραστηριότητα της νόσου, εμφανιζόμενα συνολικά περίπου στο 50-55% των περιστατικών ΣΕΛ και περίπου στο 89% των ασθενών με ΣΕΛ και ενεργή νεφροπάθεια³⁻⁷. Τα αντισώματα κατά του *dsDNA* ενδέχεται να εξαφανιστούν μετά από ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή κατά τη διάρκεια ύφεσης. Υπάρχει μεγάλη συσχέτιση ανάμεσα στη δραστηριότητα της νόσου και τα επίπεδα αντισωμάτων αντι-*dsDNA*²⁻⁷. Η μέθοδος ELISA για τον προσδιορισμό αντισωμάτων αντι-*dsDNA* ImmuLisa™ ανιχνεύει και προσδιορίζει ποσοτικά τα αντισώματα τάξης IgG κατά του *dsDNA*. Εμφανίζονται επίσης αντισώματα αντι-DNA των ισότυπων IgM και IgA, αλλά τα αντισώματα τάξης IgG έχει βρεθεί ότι έχουν κλινική σημασία³. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε διεθνείς μονάδες (IU)/ml. Τόσο ο βαθμονομητής όσο και το διάλυμα θετικού ελέγχου έχουν βαθμονομηθεί με βάση το Αντιδραστήριο Αναφοράς Wo/80 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.)⁹.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση διενεργείται ως ενζυμική ανοσοπροσοροφητική ανάλυση (ELISA) στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με κεκαθαρισμένο αντιγόνο *dsDNA* και τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων αντι-*dsDNA* του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη στις κυψελίδες σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υποστρώμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε διεθνείς μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (IU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.

Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου.

Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών ¹⁰.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA ImmuLisa™ **REF** 1120

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.






12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με το αντιγόνο δίκλωνου DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + dsDNA *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για δίκλωνο DNA.

EL

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως.
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

- LOT** Αριθμός παρτίδας
- REF** Αριθμός καταλόγου
-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
- IVD** In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλου βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση

της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2 - 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

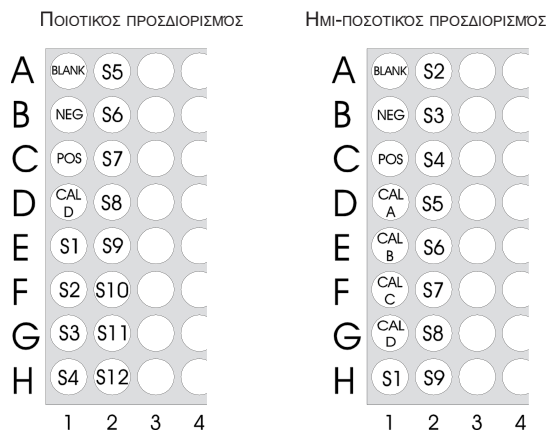
- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

Μέθοδος ανάλυσης

Βήμα 1 Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Βήμα 2 Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)
ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές Α έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.



EL

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στην κατάψυξη.
- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.
- Βήμα 7** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές τυποποιημένοι με βάση το Αντιδραστήριο Αναφοράς Wo/80 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$.

Ποιοτικός προσδιορισμός

- Το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να δίνει τιμή [IU/ml] μεγαλύτερη από αυτήν του Βαθμονομητή D
- Η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου.

Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός

- Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί.
- Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμή μικρότερη από 60 IU/ml
- Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε IU/ml.
- Το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

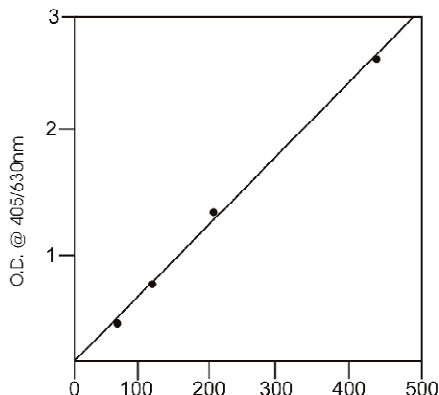
----- X IU/ml του βαθμονομητή D = IU/ml εξεταζόμενου δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομητή D

Προσδιορίστε την κατά προσέγγιση τιμή του δείγματος ασθενούς σε IU/ml χρησιμοποιώντας τον παραπάνω υπολογισμό. Αρχικά, θα πρέπει να γίνει μόνο μια διαλογή των ασθενών σε θετικούς και αρνητικούς, χρησιμοποιώντας τον ποιοτικό τρόπο υπολογισμού. Τα δείγματα που θα βρεθούν θετικά με αυτή τη μέθοδο, θα πρέπει να αξιολογηθούν εκ νέου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ημι-ποσοτικού προσδιορισμού που περιγράφεται παρακάτω, για τον ακριβή προσδιορισμό των επιπέδων των αντισωμάτων.

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε IU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Συνήθως, προκύπτει, αλλά και συνιστάται, μια γραμμική παλινδρόμηση. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησής τους.



Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση Βαθμονομητές [A - D] συμπεριλαμβάνονται στο κιτ για να παρέχουν ακριβείς ποσοτικές τιμές [IU/ml] για τα δείγματα των ασθενών και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Ο Βαθμονομητής D διατίθεται για ποιοτικούς προσδιορισμούς, ώστε να γίνει η διαλογή των ασθενών σε θετικούς και αρνητικούς, μόνον. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή A. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε IU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσης.

Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός για την ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιώντας τόσο τον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που εξετάζεται.

Τιμή αντισωμάτων αντι-dsDNA	Ερμηνεία
<50 IU/ml	Αρνητικό
50-60 IU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
> 60 IU/ml	Θετικό

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αυτή δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι οριακά, συνιστάται περαιτέρω εξέταση των παρακάτω:

- αντιπυρηνικά αντισώματα – κύτταρα HEp-2
- αντιπυρηνικά αντισώματα – τομές ιστών νεφρού ή ήπατος ποντικού
- αντισώματα αντι-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- nDNA με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Οι παραπάνω εξετάσεις διατίθενται από την εταιρεία Immco Diagnostics Inc. Ανατρέξτε στον κατάλογο προϊόντων.

Συνιστάται επίσης εξέταση για τα επίπεδα του συμπληρώματος C3 και C4, του CH50, καθώς και ανοσοσυμπλόκων. Ισχυρά θετικά αποτελέσματα υποδεικνύουν παρουσία ΣΕΛ. Ωστόσο, τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν αναγκαστικά τη διάγνωση ΣΕΛ. Όταν υπάρχει έντονη υποψία παρουσίας ΣΕΛ, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής άλλων εξετάσεων, όπως εξετάσεων για αντισώματα ANA, αντι-ENA και αντι-nDNA με ανοσοφθορισμό, καθώς και εξετάσεων των επιπέδων του συμπληρώματος. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων αντι-dsDNA

Νόσος	% συχνότητα εμφάνισης
Συστηματικός ερυθματώδης λύκος	50-55
ενεργή νεφρική νόσος	89
ενεργή μη νεφρική νόσος	56
ανενεργή νόσος	30
Πιθανός ΣΕΛ	32
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	0
Συστηματική σκληροδερμία	0
Φυσιολογικοί ασθενείς	0

Σημείωση: Η συχνότητα των αντισωμάτων κατά του dsDNA που παρατίθεται παραπάνω αντιπροσωπεύει μια συλλογή στοιχείων από τη βιβλιογραφία^{3,7}. Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει, ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων αντι-dsDNA ImmuLisa™ συγκρίθηκε με ένα διαθέσιμο στο εμπόριο kit ανάλυσης με έμμεσο ανοσοφθορισμό για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του dsDNA σε ορό ανθρώπου.

EL

Ένα σύνολο 57 ορών συλλέχθηκε από ένα κλινικό εργαστήριο αναφοράς. Οι οροί αναγνωρίστηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί στα αντισώματα αντι-*dsDNA* με έμμεσο ανοσοφθορισμό και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις προτεινόμενες από τον παρασκευαστή διαδικασίες. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σύγκριση του kit *dsDNA* ImmuLisa™ με το kit αντισωμάτων *dsDNA* έμμεσου ανοσοφθορισμού IF

		ImmuLisa™		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
ΑΛΛΟ	Θετικά	15	4	19
	Αρνητικά	3	35	38
	Σύνολο	18	39	57
		Συμφωνία:	88%	
		Ευσαιθησία:	83%	
		Ειδικότητα:	92%	

Ακρίβεια:

Δύο οροί θετικοί στα αντισώματα κατά του *dsDNA* αναλύθηκαν με το kit *dsDNA* ELISA ImmuLisa™ προκειμένου να προσδιοριστεί ο συντελεστής ποικιλότητας εντός σειράς και μεταξύ σειρών. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	Μεταξύ σειρών	Εντός σειράς
	%CV	%CV
Δείγμα 1	5,2	4,4
Δείγμα 2	3,4	10,9

Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις *dsDNA* αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος με γνωστές ποσότητες *dsDNA*. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα *dsDNA* των αναμιχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	συγκεντρ. <i>dsDNA</i> . προστιθέμενη (IU/ml)	συγκεντρ. <i>dsDNA</i> . ληφθείσα (IU/ml)	Ανάκτηση %
Δείγμα 1	178,5	192,9	108,1
Δείγμα 2	148,5	152,5	102,7
Δείγμα 3	89,0	88,1	99,0

ES



IMMCO
DIAGNOSTICS

Ensayo ELISA para detección de anticuerpos anti ADN de doble cadena (dcADN)

IVD

PROSPECTO

REF 1120 anticuerpos anti ADN de doble cadena (dcADN) 96 analisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y cuantificación de anticuerpos IgG anti ADN de doble cadena (*dcADN*) en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antinucleares (ANA) están presentes en varias patologías autoinmunes. Los ANA comprenden anticuerpos contra antígenos del núcleo tales como anti ADN, antihistona y otros antígenos nucleares extraíbles como RNP, Sm, SS-A y SS-B.

Los anticuerpos anti ADN presentan tres especificidades, a saber:

1. anticuerpos anti ADN de doble cadena (*dcADN*) que reaccionan únicamente con *dcADN*
2. anticuerpos anti ADN de cadena simple (*scADN*) que reaccionan con *scADN*
3. anticuerpos anti *dc/scADN* que reaccionan tanto con *dcADN* como con *scADN*.

De estos tres tipos, los anticuerpos anti *dcADN* son característicos del lupus eritematoso sistémico (LES) y se presentan raramente en otras patologías autoinmunes¹⁻⁶. La frecuencia y niveles de estos anticuerpos fluctúa según la actividad de la enfermedad: están presentes en alrededor del 50-55% de los casos de LES y en aproximadamente el 89% de pacientes con LES y enfermedad renal activa³⁻⁷. Los anticuerpos anti *dcADN* pueden desaparecer con un tratamiento inmunosupresor y durante la remisión. Hay una buena correlación entre la actividad de la enfermedad y los niveles de anticuerpos anti *dcADN* ⁸. El ensayo ELISA para anticuerpos anti *dcADN* ImmuLisa™ detecta y cuantifica los anticuerpos anti *dcADN* de clase IgG. Si bien también se reconocen anticuerpos anti ADN de los isotipos IgM e IgA, los clínicamente importantes son los de clase IgG ³. Los resultados se indican en Unidades Internacionales (IU)/ml. El calibrador y el control positivo se calibraron con el reactivo de referencia Wo/80 de la Organización Mundial de la Salud ⁹.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA). Los pocillos se recubren con antígeno *dcADN* purificado; los puntos que no han reaccionado se bloquean para reducir las uniones no específicas. Se incuban controles, calibradores y muestras de suero del paciente en los pocillos recubiertos de antígeno para permitir que los anticuerpos específicos anti *dcADN* presentes en el suero se unan. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas del suero se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se revelan añadiendo a los pocillos un conjugado de IgG antihumana marcado con enzima. Después de eliminar mediante lavado el conjugado que no se haya unido, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP); la presencia de anticuerpos es revelada por un cambio de color debido a la conversión del sustrato pNPP en un producto de reacción coloreado. Se detiene la reacción y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, mediante un espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales por mililitro (IU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos revestidos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Para diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCB). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹⁰.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado









ELISA para anticuerpos anti *dcADN* ImmuLisa™ REF 1120

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno <i>dcADN</i> .
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anti <i>dcADN</i> .
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos anti <i>dcADN</i> .
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos anti <i>dcADN</i> .
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos anti <i>dcADN</i> .
1 x 1.5 ml	CONTROL + dsDNA *	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano positivo a anticuerpos <i>dcADN</i> .
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene <0,1% NaN_3

Símbolos utilizados en las etiquetas:

-  LOT Número de lote
-  REF Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  IVD Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Lavador automático de placas con capacidad de 200 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°c no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO**Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos. Vuelva a poner los materiales en la nevera inmediatamente después de su uso.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

Procedimiento del ensayo

- Paso 1** Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo.
- Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** **Determinación cualitativa:** use únicamente el Low Calibrator D (*frasco de tapa amarilla*) listo para usar. **Determinación semicuantitativa:** use los calibradores listos para usar de A a D como se muestra en el ejemplo siguiente:

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

- Paso 4** Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de la muestra del paciente con **0,5 ml** de diluyente de suero.
- Paso 5** Coja los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera.
- Paso 6** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los correspondientes pocillos, como se indica en la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.
- Paso 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, estandarizados según el reactivo de referencia Wo/80 de la Organización Mundial de la Salud, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3.

Determinación cualitativa

- El control positivo debe ser superior al valor [IU/ml] del calibrador D.
- La densidad óptica del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo.

Determinación semicuantitativa

- La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0, de lo contrario será necesario repetir el análisis.
- El control negativo debe ser inferior a 60 IU/ml.
- Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de las dos lecturas para determinar las IU/ml.
- Los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

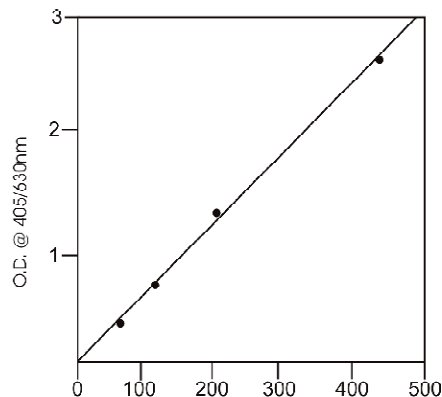
$$\frac{\text{Abs. de muestra analizada}}{\text{Abs. de Calibrador D}} \times \text{IU/ml de Calibrador D} = \text{IU/ml muestra analizada}$$

Abs. de Calibrador D

Utilizando la fórmula anterior, determine las IU/ml aproximadas de la muestra del paciente. Utilizando el modo de cálculo cualitativo, los pacientes se clasificarán únicamente como positivos o negativos. En las muestras que resulten positivas con este método, se determinará con precisión el nivel de anticuerpos evaluándolas con el método semicuantitativo indicado más abajo.

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en IU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Normalmente se obtiene una regresión lineal, que es lo recomendado. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



Calibrador

Los calibradores listos para usar [A - D] proporcionan valores cuantitativos precisos [IU/ml] de las muestras del paciente y deben utilizarse en todos los ensayos. El calibrador D se utiliza en determinaciones cualitativas para catalogar los pacientes únicamente como positivos o negativos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las IU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrán variar según la población examinada.

Valor Anti- <i>dcADN</i>	Interpretación
< 50 IU/ml	Negativo
50-60 IU/ml	Incierto (Borderline)
> 60 IU/ml	Positivo

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

Este ensayo no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano. Si los resultados fueran inciertos (borderline), se aconseja efectuar los siguientes análisis:

- Anticuerpos antinucleares - células HEp-2
- Anticuerpos antinucleares - cortes de tejido de riñón o hígado de ratón
- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- *nADN* mediante inmunofluorescencia indirecta

Los análisis arriba indicados están disponibles en Immco Diagnostics Inc. Consulte el catálogo de productos.

Se aconsejan también análisis para niveles de complemento C3 y C4, CH50 y complejos inmunes. Resultados positivos con niveles altos son indicadores de LES, pero los resultados negativos no descartan necesariamente un diagnóstico de LES. Si el médico supone fundadamente que el paciente padece LES, tomará en consideración también otros análisis, tales como anti ANA, anti ENA, anti *nADN* mediante inmunofluorescencia y niveles de complemento. Los resultados obtenidos son sólo una ayuda para el diagnóstico y no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos.

VALORES ESPERADOS

Incidencia de anticuerpos anti *dcADN*

Enfermedad	Incidencia %
Lupus eritematoso sistémico	50-55
enfermedad renal activa	89
enfermedad activa no renal	56
enfermedad inactiva	30
Posible LES	32
Artritis reumatoide	0
Esclerodermia sistémica	0
Pacientes normales	0

Nota: La frecuencia de anticuerpos anti *dcADN* indicada arriba es un resumen de datos tomados de la literatura^{3,7}. La incidencia varía según la población de pacientes.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El ensayo para anticuerpos anti *dcADN* ImmuLisa™ se comparó con un análisis por inmunofluorescencia indirecta para detectar esos mismos anticuerpos en suero humano.

Se analizaron un total de 57 sueros, procedentes de un laboratorio clínico de referencia, identificándolos mediante inmunofluorescencia indirecta como positivos o negativos a anticuerpos anti *dcADN*; luego, se los analizó conforme con el procedimiento aconsejado por el fabricante. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Comparación del ensayo para anticuerpos anti *dcADN* ImmuLisa™ con un ensayo para anticuerpos anti *dcADN* mediante inmunofluorescencia indirecta

		ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Total
OTRO	Positivo	15	4	19
	Negativo	3	35	38
	Total	18	39	57

Correspondencia: 88%
Sensibilidad: 83%
Especificidad: 92%

Precisión:

El coeficiente de variación intra ensayo y entre ensayo se determinó analizando dos sueros positivos a *dcADN* con el ensayo ELISA para anticuerpos anti *dcADN* ImmuLisa™. Los resultados son los siguientes:

	entre ensayo	intra ensayo
	%CV	%CV
Muestra 1	5,2	4,4
Muestra 2	3,4	10,9

Recuperación:

Muestras con concentraciones conocidas de *dcADN* se mezclaron con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades conocidas de *dcADN*. Se determinaron los niveles de *dcADN* de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

	conc. <i>dcADN</i> añadida (IU/ml)	conc. <i>dcADN</i> obtenida (IU/ml)	% Recuperación
Muestra 1	178,5	192,9	108,1
Muestra 2	148,5	152,5	102,7
Muestra 3	89,0	88,1	99,0



Anti-dsDNA-Antikörper-ELISA

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1120 Anti-dsDNA-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) liegen bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten vor. Zu den ANA gehören Antikörper gegen die Antigene des Zellkerns, z.B. gegen die DNA, gegen Histon sowie gegen verschiedene extrahierbare nukleäre Antigene, z.B. RNP, Sm, SS-A und SS-B. Es gibt drei spezifische Arten von Anti-DNA-Antikörpern. Diese sind:

1. Anti-dsDNA-Antikörper, die nur mit dsDNA reagieren
2. Anti-ssDNA-Antikörper, die mit ssDNA reagieren
3. Anti-ds/ssDNA-Antikörper, die sowohl mit dsDNA als auch mit ssDNA reagieren.

Von diesen drei Arten sind die Anti-dsDNA-Antikörper typisch für systemischen Lupus erythematodes (SLE). Sie treten nur selten bei anderen Autoimmunkrankheiten auf¹⁻⁶. Die Häufigkeit und der Spiegel dieser Antikörper schwanken mit der Krankheitsaktivität; sie treten insgesamt in etwa 50-55% aller SLE-Fälle und etwa 89% der SLE-Patienten mit aktiver Nierenerkrankung auf³⁻⁷. Anti-dsDNA-Antikörper können während der Behandlung mit Immunsuppressiva und während der Remission vollständig zurückgehen. Es besteht eine gute Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und dem Spiegel der Anti-dsDNA-Antikörper⁸. Der ImmuLisa™ Anti-dsDNA-Antikörper-ELISA-Test findet und quantifiziert Anti-dsDNA-Antikörper der Klasse IgG. Anti-DNA-Antikörper der Isotypen IgM und IgA treten ebenfalls auf; es wurde jedoch nachgewiesen, dass die Antikörper der Klasse IgG klinisch relevant sind⁹. Die Ergebnisse werden in Internationalen Einheiten (IU)/ml angegeben. Sowohl der Kalibrator als auch das positive Kontrollserum wurden gemäß dem Referenzreagenz Wo/80 der World Health Organization (WHO) kalibriert⁹.

TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasen-ELISA durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit gereinigtem dsDNA-Antigen beschichtet, und die unreaktierten Stellen werden blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Anti-dsDNA-Antikörper. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml) angegeben.

REAGENZILIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

DE

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser.

Die beschichteten Mikrotitervertiefungsstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁰.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metalazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmLISA™ dsDNA-Antikörper-ELISA REF 1120

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit dsDNA-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen dsDNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen dsDNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen dsDNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen dsDNA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + dsDNA *	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält dsDNA-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau.

DE

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Gebrauchsfertiges **Enzymsubstrat**. Enthält pNPP. **Vor Licht schützen**.

1 x 12 ml **STOP**

Gebrauchsfertige **Stopplösung**.

2 x **BUF WASH**

Waschpuffer in Pulverform. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.


* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

IVD In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Verfahren

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht

haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.

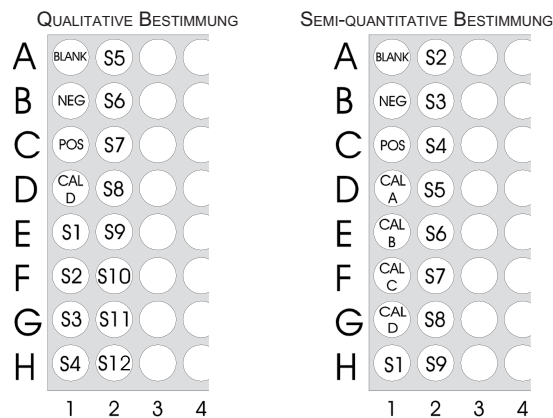
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).
oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



Schritt 4 Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.

Schritt 5 Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank.

Schritt 6 Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.

Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.

- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **4x** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, die gegen das Referenzreagenz Wo/80 der World Health Organization (WHO) standardisiert wurden, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte $<0,3$ sein.

Qualitative Bestimmung

- Der Wert des positiven Kontrollserums sollte über dem Wert [IU/ml] von Kalibrator D liegen.
- Der Extinktionswert von Kalibrator D muss über dem Wert des negativen Kontrollserums und unter dem Wert des positiven Kontrollserums liegen.

Semi-quantitative Bestimmung

- Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden.
- Der Wert des negativen Kontrollserums muss unter 60 IU/ml liegen.
- Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die IU/ml zu bestimmen.
- Die Werte des positiven Kontrollserums müssen innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

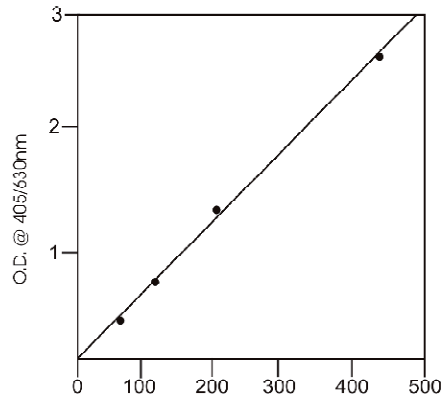
----- X IU/ml von Kalibrator D = IU/ml Testprobe

Ext. von Kalibrator D

Bestimmen Sie die ungefähren IU/ml der Patientenprobe mit der oben angegebenen Formel. Die qualitative Berechnungsmethode sollte nur verwendet werden, um Patienten als positiv oder negativ einzuordnen. Proben, die mit dieser Methode für positiv befunden werden, sollten mit der unten angegebenen semi-quantitativen Methode erneut bewertet werden, um den genauen Antikörperspiegel zu bestimmen.

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in IU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Im Normalfall wird eine lineare Regression erhalten und empfohlen. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren [A-D] sind im Kit enthalten, um genaue quantitative Werte [IU/ml] für Patientenproben zu liefern; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Kalibrator D dient der qualitativen Bestimmung, bei der Patienten ausschließlich als positiv oder negativ eingeordnet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorenkurve fallen. Um die IU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse sowohl bei der qualitativen als auch bei der quantitativen Bestimmung. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen. Diese können je nach der untersuchten Patientenpopulation schwanken.

Anti-dsDNA-Wert	Interpretation
50 IU/ml	Negativ
50-60 IU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
> 60 IU/ml	Positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiologisch verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Im Fall von Testergebnissen im Grenzbereich wird empfohlen, die folgenden weiteren Tests durchzuführen:

- Antinukleäre Antikörper - Hep-2-Zellen
- Antinukleäre Antikörper - Gewebeschnitte von Mäusenieren oder Mäuseleber
- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La
- *n*DNA mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die oben genannten Tests sind von Immco Diagnostics Inc. erhältlich (siehe Produktkatalog).

Es wird außerdem vorgeschlagen, Tests auf die Komplementspiegel von C3, C4 und CH50 sowie auf Immunkomplexe durchzuführen. Stark positive Ergebnisse sind ein Anzeichen für SLE. Negative Ergebnisse können jedoch eine SLE-Diagnose nicht ausschließen. Falls ein starker Verdacht auf SLE besteht, sollten andere Tests, z.B. auf ANA, Anti-ENA, Anti-*n*DNA mittels Immunfluoreszenz sowie Komplementspiegel, in Erwägung gezogen werden. Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden.

ERWARTETE WERTE

Häufigkeit von Anti-dsDNA-Antikörpern

Krankheit	Häufigkeit %
Systemischer Lupus Erythematoses	50-55
aktiv mit Nierenkrankheit	89
aktiv ohne Nierenkrankheit	56
inaktiv	30
Möglicher SLE	32
Rheumatoide Arthritis	0
Systemische Sklerodermie	0
Normale Patienten	0

Anmerkung: Die oben angegebene Häufigkeit von *ds*DNA-Antikörpern wurde aus der Literatur zusammengestellt^{3,7}. Die Häufigkeit schwankt je nach Patientenpopulation.

LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmuLisa™ Anti-*ds*DNA-Antikörpertest wurde mit einem im Handel erhältlichen Kit für einen indirekten Immunfluoreszenztest zur Bestimmung von Antikörpern gegen *ds*DNA in Humanserum verglichen.

Von einem klinischen Referenzlabor wurden insgesamt 57 Seren bezogen. Diese wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz als positiv oder negativ für Anti-*ds*DNA-Antikörper identifiziert und gemäß den vom Hersteller empfohlenen Verfahren getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

DE

Vergleich von ImmuLisa™ dsDNA mit dem indirekten Immunfluoreszenz IF dsDNA-Antikörperkit

		ImmuLisa™		
		Positiv	Negativ	Gesamt
ANDERER TEST	Positiv	15	4	19
	Negativ	3	35	38
	Gesamt	18	39	57

Übereinstimmung: 88%
Sensitivität: 83%
Spezifität: 92%

Genauigkeit:

Zwei dsDNA-positive Seren wurden mit dem ImmuLisa™ dsDNA-ELISA getestet, um die inter- und intraserielle Variabilität zu bestimmen. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	interseriell	intraseriell
	%VK	%VK
Probe 1	5,2	4,4
Probe 2	3,4	10,9

Wiederfindung:

Proben mit bekannter dsDNA-Konzentration wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an dsDNA gemischt. Die dsDNA-Spiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	dsDNA-Konz.	dsDNA-Konz.	% Wiederfindung
	zugefügt (IU/ml)	gemessen (IU/ml)	
Probe 1	178,5	192,9	108,1
Probe 2	148,5	152,5	102,7
Probe 3	89,0	88,1	99,0



Anticorps anti-ADN double brin ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1120 Anticorps dsDNA ELISA 96 Tests

USAGE PREVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA pour la détection et la quantification des anticorps IgG de l'ADN double brin (dsDNA) dans le sérum humain.

RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps antinucléaires (ANA) se retrouvent dans plusieurs maladies auto-immunes. Les anticorps antinucléaires (ANA) comprennent des anticorps des antigènes du noyau tel que l'ADN, l'histone et plusieurs antigènes nucléaires extractibles tels que RNP, Sm, SS UN et SS-B. Il existe trois spécificités d'anticorps anti-ADN:

1. des anticorps anti-ADN double brin qui réagissent seulement avec l'ADN double brin
2. des anticorps anti-ADN double brin qui réagissent seulement avec l'ADN simple brin
3. des anticorps anti-ADN double brin/simple brin qui réagissent aussi bien avec l'ADN double brin qu'avec l'ADN simple brin

De ces trois types, les anticorps anti-ADN double brin sont caractéristiques du lupus systémique érythémateux (SLE). Ils se manifestent rarement dans d'autres maladies auto-immunes¹⁻⁶. La fréquence et les niveaux de ces anticorps fluctuent avec l'activité de la maladie, on les retrouve en général dans approximativement 50-55% des cas de SLE et chez approximativement 89% des malades SLE présentant une maladie rénale active³⁻⁷. Les anticorps de l'ADN double brin disparaissent à l'occasion d'un traitement immunosuppresseur et durant la rémission. Il existe une bonne corrélation entre l'activité de la maladie et les niveaux d'anticorps anti-ADN double brin⁸. Le dosage ELISA des anticorps anti-ADN double brin ImmuLisa™ détecte et quantifie les anticorps ADN double brin de la classe IgG. Des anticorps anti-ADN d'isotypes IgM et IgA se manifestent aussi, mais les anticorps de la classe IgG se sont montrés significatifs du point de vue clinique³. Les résultats sont fournis en Unités Internationales (IU)/ml. Aussi bien le étalon que la régulation positive ont été étalonnés par rapport au réactif de référence WO/80 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test est exécuté sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (*solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA*). Des microplaques à puits sont enduites avec un antigène de l'ADN double brin et les sites inaltérés sont bloqués pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les étalons et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques anti-ADN double brin qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés en ajoutant aux puits un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat de pNPP en un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en Unités Internationales par millilitre (IU/ml).

REACTIFS

Stockage et Préparation

Entreposer tous les réactifs entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage.

Quand il est entreposé entre 2 et 8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage en 1 litre, avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée.

Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Pour usage diagnostique *in vitro*. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ce matériel.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN₃) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au responsable du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni

ImmLISA™ anticorps dsDNA ELISA **REF** 1120

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène dsDNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CONTROL + dsDNA *	Régulation positive (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ds-DNA.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulation négative (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.

FR

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. **Protéger de la lumière.**

1 x 12 ml **STOP**

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

2 x **BUF WASH**

Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient <0,1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou atteints de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats du test et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pour un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCEDURE

Notes de procédure

- Avant de commencer le test, lire avec soin la brochure accompagnant le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la

procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.

- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs devrait avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

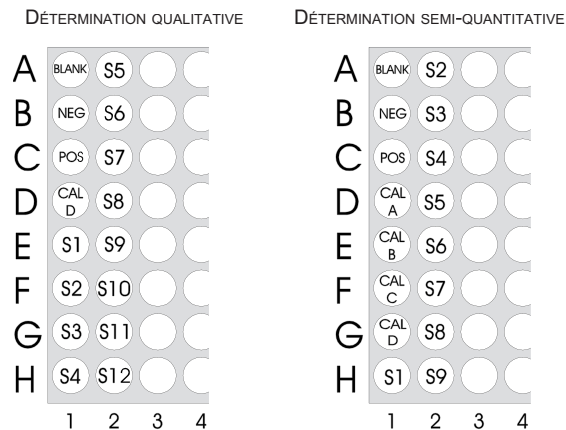
Méthode de test

Etape 1 Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

Etape 2 Étiqueter les feuillets de protocole pour indiquer le placement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

Etape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement l'Étalon Bas D prêt à l'emploi (*flacon avec couvercle jaune*).

ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Etalons A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



Etape 4 Préparer une dilution 1:101 des échantillons patients en mélangeant 5 µl du sérum patient avec 0.5 ml de diluant de sérum.

Etape 5 Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur.

Etape 6 Pipeter **100 µl** des étalons prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés, conformément au feuillet de protocole.

Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif blanco. Mettre le lecteur ELISA à zéro sur le réactif blanco.

FR

- Etape 7** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Eliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- Etape 9** Pipeter **100 μ l** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Etape 12** Pipeter **100 μ l** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipeter **100 μ l** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou a double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif blanco programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Les étalons, répondant au standard du réactif de référence WO/80 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés lors de chaque test pour vérifier la conformité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco devrait être < 0.3 .

Dosage qualitatif

- Le régulateur positif doit être supérieur à la valeur [IU/ml] de l'Etalon D.
- La densité optique de l'Etalon D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif.

Dosage semi-quantitatif

- L'étalon A doit présenter une lecture d'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé.
- Le régulateur négatif doit être inférieur à 60 IU/ml
- Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer IU/ml
- Le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

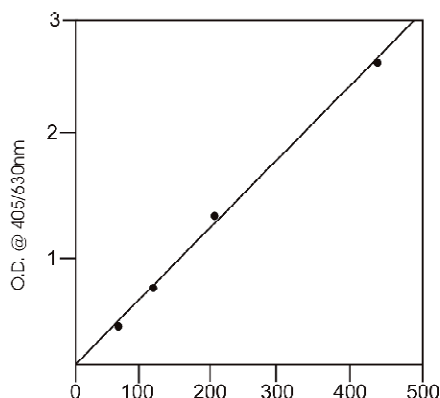
----- X IU/ml de l'étalon D = IU/ml échantillon d'essai

Abs. de l'étalon D

Déterminer le IU/ml approximatif de l'échantillon patient en ayant recours au calcul ci-dessus. Les patients doivent être dépistés uniquement comme positifs ou négatifs, en utilisant la modalité qualitative de calcul. Les échantillons qui sont trouvés positifs en utilisant cette méthode doivent être évalués en ayant recours à la méthode semi-quantitative, ci-dessous, pour procéder à une détermination exacte des niveaux d'anticorps.

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption des étalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en IU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Normalement, une régression linéaire est obtenue et est recommandée. Déterminer les concentrations des échantillons patients de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.



Etalon

Les étalons prêts à l'emploi [A - D] sont inclus pour fournir des valeurs quantitatives exactes [IU/ml] pour les échantillons patients et doivent être utilisés à chaque opération. L'étalon D est fourni pour les dosages qualitatifs afin de dépister les patients comme étant positifs ou négatifs seulement. Les échantillons patients qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe de l'étalon quand on refait le test. Pour la détermination IU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous fait uniquement fonction de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire, en utilisant aussi bien les dosages qualitatifs que quantitatifs. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier avec la population examinée.

Valeur anti-ADN double brin	Interprétation
< 50 IU/ml	Négatif
50-60 IU/ml	Indéterminé (cas limite)
> 60 IU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROCEDURE

Le test ne doit pas être réalisé sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit être utilisée uniquement pour le test d'échantillons de sérum humain. Quand les résultats du test se présentent comme un cas limite, un test supplémentaire est conseillé :

- Anticorps antinucléaires - cellules HEp-2
- Anticorps antinucléaires – sections de tissu de foie ou de rein de souris

FR

- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- nADN par immunofluorescence indirecte

Les tests ci-dessus peuvent être fournis par Immco Diagnostics Inc., on est prié de consulter le catalogue des produits.

Un test des niveaux de complément C3 et C4, CH50 et des complexes immuns est également conseillé. Des résultats nettement positifs sont indicatifs de SLE. Cependant, des résultats négatifs ne sont pas en mesure d'éliminer catégoriquement un diagnostic de lupus érythémateux systémique (SLE). Quand on soupçonne fortement l'existence d'un SLE, d'autres tests, tels que les anticorps antinucléaires anti-ENA, anti-nADN par immunofluorescence et niveaux de complément doivent également être envisagés. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes.

VALEURS ATTENDUES

Incidence des anticorps anti ADN double brin

Maladie	Incidence %
Lupus érythémateux systémique	50-55
Maladie rénale active	89
Maladie non rénale active	56
Maladie inactive	30
SLE possible	32
Polyarthrite rhumatoïde	0
Sclérodermie systémique	0
Patients normaux	0

Note : L'incidence des anticorps de l'ADN double brin ci-dessus correspond à une compilation de la littérature ^{3,7}. L'incidence varie selon la population des patients.

DONNEES DE RENDEMENT

Le test ImmuLisa™ anti-ADN double brin a été comparé avec un kit de test par immunofluorescence pour la détection des anticorps de l'ADN double brin dans le sérum humain disponible dans le commerce.

Un total de 57 sérums a été obtenu d'un laboratoire de référence clinique. Ils ont été identifiés comme positif ou négatif pour les anticorps anti-ADN double brin par immunofluorescence indirecte et ont été testés conformément aux procédures recommandées par le fabricant. Les résultats sont repris dans le tableau :

Comparaison de ImmuLisa™ ADN double brin avec un kit de test par immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps de l'ADN double brin

		ImmuLisa™		
		Positif	Négatif	Total
AUTRES TEST	Positif	15	4	19
	Négatif	3	35	38
	Total	18	39	57

Concordance : 88%
Sensibilité : 83%
Spécificité : 92%

FR

Précision :

Deux sérums positifs ADN double brin ont été testés avec Immulisa™ DS DNA ELISA pour déterminer la variabilité inter et intra-essai. Les résultats sont les suivants :

	inter-essai	intra-essai
	%CV	%CV
Échantillon 1	5,2	4,4
Échantillon 2	3,4	10,9

Récupération :

Des échantillons avec des concentrations d'ADN double brin connues ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon positif contenant des quantités connues d'ADN double brin. Les niveaux d'ADN double brin des échantillons mélangés ont été déterminés et le pourcentage de récupération calculé sur la base des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	conc. ADN double brin ajouté (IU/ml)	conc. ADN double brin obtenu (IU/ml)	% Récupération
Échantillon 1	178,5	192,9	108,1
Échantillon 2	148,5	152,5	102,7
Échantillon 3	89,0	88,1	99,0



Anticorpi Anti-dsDNA (ELISA)

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1120 Anticorpi Anti-DNA a doppia elica (dsDNA) 96 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca e la quantificazione di anticorpi anti-DNA a doppia elica (dsDNA) di classe IgG nel siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli anticorpi anti-nucleari (ANA) compaiono in varie malattie autoimmuni. Gli ANA includono anticorpi contro gli antigeni nucleari come quelli anti-DNA e anti-istone e contro vari antigeni nucleari estraibili come quelli anti- RNP, Sm, SS-A and SS-B. Si hanno tre specificità con gli anticorpi anti-DNA:

1. anticorpi anti-dsDNA che reagiscono solo con il dsDNA
2. anticorpi anti-ssDNA che reagiscono con il ssDNA
3. anticorpi anti-ds/ssDNA che reagiscono sia con il dsDNA che con il ssDNA.

Di questi tre tipi, gli anticorpi anti-dsDNA sono caratteristici del lupus eritematoso sistemico (LES) e compaiono raramente in altre malattie autoimmuni¹⁻⁶. La frequenza e i livelli di questi anticorpi fluttuano con l'attività della malattia e compaiono complessivamente in circa il 50-55% dei casi di LES e in circa l'89% dei pazienti affetti da LES con nefropatie attive³⁻⁷. Gli anticorpi anti-dsDNA possono scomparire in seguito a trattamento immunosoppressivo e durante la fase di remissione. Esiste una buona correlazione tra l'attività della malattia e i livelli degli anticorpi anti-dsDNA⁸. Il test per gli Anticorpi Anti-dsDNA ELISA ImmuLisa™ rileva e quantifica gli anticorpi anti-dsDNA di classe IgG. Si riscontrano anche anticorpi anti-DNA di classe IgM e IgA, ma è stato dimostrato che quelli di classe IgG hanno rilevanza clinica³. I risultati sono riportati in Unità Internazionali (IU)/ml. Sia il Calibratore che Il Controllo Positivo sono stati calibrati contro il Reagente di Riferimento Wo/80 della World Health Organization (WHO)⁹.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigene dsDNA purificato; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi anti-dsDNA presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati vengono rilevati da un coniugato anti IgG umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in Unità Internazionali per millilitro (IU)/ml.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata.

Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁰.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN_3) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi anti-dsDNA ELISA ImmuLisa™ **REF** 1120

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-dsDNA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-dsDNA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + dsDNA *	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per dsDNA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Coniugato in Fosf. Alc. Anti IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso . Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a 1 litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN_3

Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

IT



Scadenza



Temperatura di conservazione



Leggere le istruzioni per l'uso



Usò diagnostico in vitro



Produttore



Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (*fiala con tappo giallo*), mentre per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori standardizzati contro il Reagente di Riferimento Wo/80 della World Health Organization (WHO), controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3.

Determinazione qualitativa:

- Il Controllo Positivo deve avere un valore [IU/ml] maggiore di quello del Calibratore D.
- Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo.

Determinazione semiquantitativa

- Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test.
- Il controllo negativo deve essere inferiore a 60 IU/ml.
- Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le IU/ml si deve prendere la media delle due letture.
- Il Controllo Positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

Assorbanza del campione del test

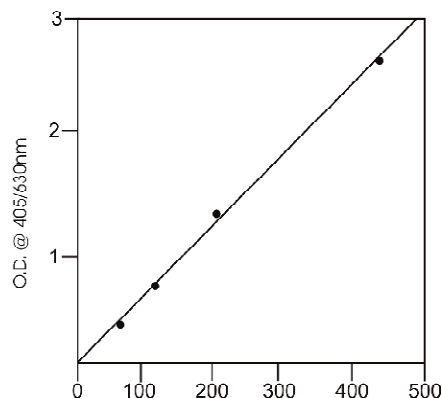
----- X IU/ml di Calibratore D = IU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

Determinare le IU/ml approssimative del campione del paziente utilizzando il metodo di calcolo indicato sopra. I campioni dei pazienti dovrebbero essere testati come positivi o negativi utilizzando il metodo di calcolo qualitativo. I campioni che risultano positivi usando questo metodo devono essere valutati nuovamente utilizzando il metodo semiquantitativo, indicato sotto, per la determinazione accurata dei livelli anticorpali.

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in IU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Tipicamente si ottiene una regressione lineare che è consigliata. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



Calibratore

I Calibratori [A - D] pronti all'uso sono inclusi nel kit per fornire valori quantitativi accurati [IU/ml] per i campioni dei pazienti e devono essere usati in ogni serie di analisi. Il Calibratore D viene fornito per le determinazioni quantitative, per testare i pazienti unicamente come positivi o negativi. I campioni dei pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le IU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati utilizzando le determinazioni qualitative e quantitative. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali, che possono variare in base alla popolazione esaminata.

Valore anti-dsDNA	Interpretazione
< 50 IU/ml	Negativo
50-60 IU/ml	Borderline
> 60 IU/ml	Positivo

LIMITAZIONI DEL TEST

Il test non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. Quando i risultati del test sono borderline, si raccomanda l'esecuzione di ulteriori analisi.

- Anticorpi antinucleari su cellule epiteliali HEp-2
- Anticorpi antinucleari - sezioni di tessuto di fegato/rene di topo
- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- nDNA per immunofluorescenza indiretta

I test menzionati sopra sono disponibili da Immco Diagnostics Inc., fare riferimento al Catalogo Prodotti.

Si consiglia inoltre di eseguire analisi per il complemento livelli C3 e C4, per CH50 e per immunocomplessi. Risultati fortemente positivi sono indicativi di LES. Tuttavia, i risultati negativi non escludono necessariamente una diagnosi di LES. Quando si ha un forte sospetto di LES, dovrebbero essere considerati altri test come quelli per gli ANA, per gli anti-ENA, anti-nDNA in immunofluorescenza e i livelli del complemento. I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi, considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica.

VALORI ATTESI

Incidenza di Anticorpi Anti-dsDNA

Malattia	Incidenza %
Lupus eritematoso sistemico	50-55
Nefropatie attive	89
Nefropatie non attive	56
Malattia inattiva	30
Possibile LES	32
Artrite Reumatoide	0
Scleroderma Sistemico	0
Individui normali	0

Nota: La frequenza degli anticorpi anti-dsDNA indicata sopra è estratta dalla letteratura^{3,7}. L'incidenza varia in base alla popolazione dei pazienti.

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Il test per la ricerca di anticorpi anti-dsDNA ImmuLisa™ è stato confrontato con altri kit di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi anti-dsDNA nel siero umano disponibili in commercio.

Complessivamente 57 sieri provenienti da un laboratorio clinico di riferimento sono stati identificati, mediante immunofluorescenza indiretta, come positivi o negativi per gli anticorpi anti-dsDNA. Questi sieri sono stati testati secondo la procedura raccomandata dal produttore. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

Comparazione del test dsDNA ImmuLisa™ con il Kit Anticorpi dsDNA per immunofluorescenza indiretta IF

		ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Totale
ALTRO	Positivo	15	4	19
	Negativo	3	35	38
	Totale	18	39	57

Concordanza: 88%

Sensibilità: 83%

Specificità: 92%

Precisione:

Due sieri positive per dsDNA sono stati testati con il kit dsDNA ELISA ImmuLisa™ per determinare la variabilità all'interno di un saggio e tra un saggio e l'altro. I risultati sono i seguenti:

	inter-analisi	intra-analisi
	%CV	%CV
Campione 1	5,2	4,4
Campione 2	3,4	10,9

Recupero:

Campioni con concentrazioni note di dsDNA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di dsDNA. I livelli di dsDNA dei campioni miscelati sono stati determinati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono i seguenti:

	Conc. dsDNA addizionato IU/ml	Conc. dsDNA ottenuta (IU/ml)	% Recupero
Campione 1	178,5	192,9	108,1
Campione 2	148,5	152,5	102,7
Campione 3	89,0	88,1	99,0



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA Anticorpos Anti-dsDNA

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1120 ELISA para Anticorpos Anti-dsADN 96 Determinações

APLICAÇÃO

Um imunoensaio enzimático (ELISA) para a detecção e a quantificação dos anticorpos IgG contra ADN de hélice dupla (*dsADN*) em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) encontram-se em diversas doenças auto-imunes. Os ANA incluem os anticorpos contra antígenos do núcleo tais como o ADN, a histona e os diversos antígenos nucleares extraíveis, tais como RNP, Sm, SS-A e SS-B. Com os anticorpos anti-ADN ocorrem três especificidades.

Estes incluem:

1. anticorpos anti-*dsADN* que só reagem com *dsADN*
2. anticorpos anti-*ssADN* que reagem com *ssADN*
3. anticorpos anti-*ds/ssADN* que reagem com *dsADN* e *ssADN*.

Destes três tipos, os anticorpos anti-*dsADN* são característicos de Lúpus eritematoso sistémico (LES). Apresentam-se raramente noutras doenças auto-imunes¹⁻⁶. A frequência e os níveis destes anticorpos variam com a actividade da doença que acontece na globalidade em aproximadamente 50 a 55% dos casos de LES e em aproximadamente 89% dos doentes com LES com doença renal activa³⁻⁷. Os anticorpos contra o *dsADN* podem desaparecer com um tratamento imunossupressor e durante a remissão. Existe uma boa correlação entre a actividade da doença e os níveis de anticorpos anti-*dsADN*⁸. O teste ELISA para Anticorpos Anti-*dsADN* ImmuLisa™ detecta e quantifica os anticorpos *dsADN* da classe IgG. Também ocorrem anticorpos Anti-ADN dos isótipos IgA e IgM, mas os anticorpos da classe IgG foram demonstrados como sendo clinicamente significativos³. Os resultados são apresentados em Unidades Internacionais (UI)/ml. Tanto o calibrador como o controlo positivo foram calibrados de acordo com o Reagente de Referência Wo/80⁹ da Organização Mundial de Saúde (OMS).

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é executado como um imunoensaio de absorção ligado a enzima de fase sólida. Os micropoços são revestidos com antígeno *dsADN* purificado e os locais não reactivos são bloqueados para reduzir ligações não específicas. Os controlos, os calibradores e as amostras de soro do doente são incubados nos poços revestidos com antígeno o que permite a ligação específica dos anticorpos anti-*dsADN* presentes no soro. Os anticorpos que não se ligaram e outras proteínas do soro são eliminados lavando os micropoços. Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima aos poços. O conjugado que não se tiver ligado é eliminado por lavagem. Depois junta-se um Substrato enzimático específico (pNPP) aos poços e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato pNPP num produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes de 2 a 8 °C. **Não congele.**

Não use o reagente se esse não estiver límpido ou se apresentar um precipitado. Os reagentes deverão estar à temperatura ambiente (20 a 25° C) antes de serem utilizados.

PT

Quando conservado de 2 a 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada.

As tiras de micropoços revestidas só devem ser usadas uma vez.

Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais¹⁰.

ATENÇÃO – a azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as tubagens de cobre ou chumbo para formar azidas metálicas muito explosivas. Na eliminação de líquidos, juntar quantidades abundantes de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro Anti-Venenos.

Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas as instruções que acompanham este kit. Não troque os componentes do kit por componentes de origem diferente do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos Anti-dsADN ImmuLisa™ REF 1120

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antígeno dsADN.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A dsDNA *	Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos contra dsADN.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B dsDNA *	Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos contra dsADN.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C dsDNA *	Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos contra dsADN.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D dsDNA *	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos contra dsADN.
1 x 1,5 ml	CONTROL + dsDNA *	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para dsADN.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPPOS *	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.

PT

2 x

BUF	WASH
-----	------

Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém <0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:


 Número de lote

 Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

 Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água desionizada ou destilada
- Frasco para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas para 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipêmicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**

PT

- Use uma pipeta multicanal com a capacidade de encher 8 poços simultaneamente. Isso torna o processo mais rápido e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adição de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e na mesma sequência.
- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no congelador.

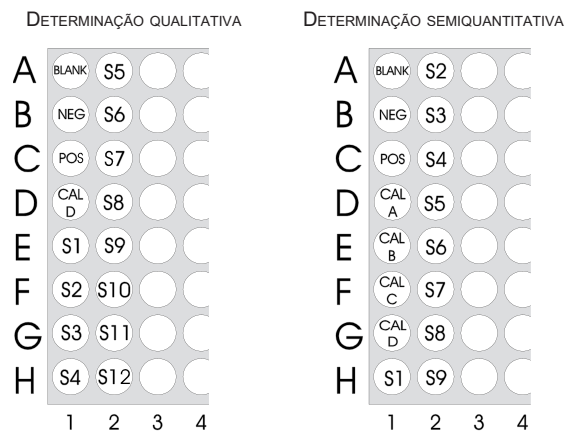
Método do teste

Passo 1 Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.

Passo 2 Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste das amostras em duplicado.

Passo 3 Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).

ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D prontos a usar como descrito no esquema abaixo.



Passo 4 Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro.

Passo 5 Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas.

Passo 6 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nas respectivas micropoços de acordo com a folha de protocolo.

Nota: Inclua também uma micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.

Passo 7 Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.

Passo 8 Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força os poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.

Passo 9 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nas micropoços.

Passo 10 Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.

PT

- Passo 11** Lave todos os micropoços como no Passo 8.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.
- Passo 15** Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas a comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Em cada teste devem ser utilizados Calibradores, padronizados em comparação com o Reagente de Referência Wo/80 da Organização Mundial de Saúde (WHO), com os Controlos Positivo e Negativo e com um branco de reagente para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser $< 0,3$.

Determinação Qualitativa

- O Controlo Positivo deverá ser superior ao valor [UI/ml] do Calibrador D
- A densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do Controlo Negativo e inferior à absorvância do Controlo Positivo

Determinação Semiquantitativa

- O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido.
- O Controlo Negativo deverá ser inferior a 60 UI/ml
- Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UI/ml deverá ser calculada a média das duas leituras
- O Controlo Positivo deverá dar valores dentro do intervalo referido na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras dos clientes podem ser determinadas por um dos dois métodos seguintes:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

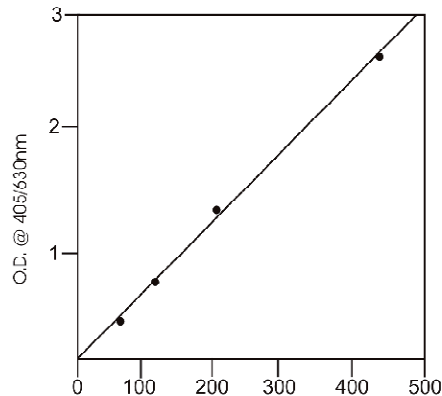
----- X UI/ml de Calibrador D = UI/ml da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

Determine o UI/ml aproximado da amostra do doente através do cálculo acima. Os doentes só deverão ser determinados como positivos ou negativos usando o modo qualitativo de cálculo. As amostras registadas como positivas utilizando este método deverão ser novamente analisadas utilizando o método semiquantitativo, abaixo, para uma determinação dos níveis de anticorpos com maior precisão.

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Trace a absorvância do Calibrador A ao D em relação à respectiva concentração em papel milimétrico linear. Trace a concentração em UI/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e desenhe a curva de melhor ajuste. Tipicamente obtém-se e recomenda-se uma regressão linear. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao respectivo valor de absorvância.



Calibrador

Os Calibradores [A - D], prontos a usar, destinam-se à obtenção de valores quantitativos com precisão [UI/ml] das amostras do doente e deverão ser usados em todos os testes. O Calibrador D destina-se unicamente à determinação qualitativa dos doentes como positivos ou negativos. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de UI/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

Interpretação

Os valores abaixo servem somente como auxílio na interpretação dos resultados de laboratório usando ambas as determinações, qualitativas ou quantitativas. Cada laboratório deverá determinar os seus próprios valores normais. Esses poderão variar em função da população examinada.

Valor Anti-dsADN	Interpretação
< 50 UI/ml	Negativo
50-60 UI/ml	Indeterminado (Limiar)
> 60 UI/ml	Positivo

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste não deve ser efectuado em amostras muito hemolisadas, contaminadas com micróbios ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Quando os resultados dos testes estiverem nos limites, são aconselhados os seguintes testes:

- Anticorpos Anti-nucleares - células HEp-2
- Anticorpos Anti-nucleares - Secções de tecido de Rim ou de Fígado de murganho
- Anti-ENA - RNP, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La)
- nADN por imunofluorescência indirecta

Os testes acima podem ser fornecidos pela Immco Diagnostics Inc., por favor consulte o Catálogo dos Produtos.

Também se aconselham os testes de níveis complementares C3 e C4, CH50 e complexos imunes. Resultados fortemente positivos indicam a presença de LES. Contudo, os resultados negativos não invalidam necessariamente um diagnóstico de LES. Quando existe uma grande dúvida de presença de LES, deverão ser considerados outros testes, tais como ANA anti-ENA, anti-nADN por imunofluorescência e níveis complementares. Os resultados obtidos servem apenas como auxílio do diagnóstico e não deverão ser interpretados já como um diagnóstico.

VALORES PREVISTOS**Incidência de Anticorpos Anti-dsADN**

Doença	Incidência %
Lúpus Eritematoso Sistémico	50-55
doença renal activa	89
doença não-renal activa	56
doença inactiva	30
Possível LES	32
Artrite Reumatóide	0
Esclerodermia Sistémica	0
Doentes Normais	0

Nota: A frequência de anticorpos dsADN acima mencionada foi extraída da literatura⁷. As variações de incidência dependem da população de doentes.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Teste de Anticorpos Anti-dsADN ImmuLisa™ foi comparado com um kit de teste de imunofluorescência indirecta adquirido no comércio para a detecção de anticorpos anti-dsADN em soro humano.

Foi obtido um total de 57 soros de um laboratório de referência clínica. Esses foram identificados como positivos ou negativos para anticorpos anti-dsADN por imunofluorescência indirecta e foram testados de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Os resultados estão resumidos na seguinte Tabela:

Comparação entre o dsADN ImmuLisa™ e o Kit de IF para Anticorpos dsADN por imunofluorescência indirecta

		ImmuLisa™		Total
		Positivo	Negativo	
OUTROS TEST	Positivo	15	4	19
	Negativo	3	35	38
	Total	18	39	57

Concordância: 88%

Sensibilidade: 83%

Especificidade: 92%

Precisão:

Foram testados dois soros positivos dsADN com o ELISA para Anticorpos Anti-dsADN ImmuLisa™ para determinar a variabilidade inter- e intra-teste. Os resultados são os seguintes:

	inter teste	intra teste
	%CV	%CV
Amostra 1	5,2	4,4
Amostra 2	3,4	10,9

Recuperação:

As amostras com concentrações dsADN conhecidas são misturadas em diluições adequadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas de dsADN. Os níveis de dsADN das amostras misturadas são determinados e a percentagem de recuperação calculada pelos valores obtidos. Os resultados são os seguintes:

	dsDNA conc. adicionada (IU/ml)	dsDNA conc. obtida (IU/ml)	% Recuperação
Amostra 1	178,5	192,9	108,1
Amostra 2	148,5	152,5	102,7
Amostra 3	89,0	88,1	99,0

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Feltkamp TEW (Ed). The significance of the determination of anti-DNA and DNA/anti-DNA complexes. Scand J Rheumatol Suppl. 1975; 11:7-64.
2. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol. 1989; 44:93-151.
3. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA et al. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. Clin Exp Rheumatol. 1987; 5:247-253.
4. Ruffatti A, Calligaro A, Ross D et al. Anti-double stranded DNA antibodies in the healthy elderly: prevalence and characteristics. J Clin Immunol. 1990; 10:300-303.
5. Kadlubowski M, Jackson M, Yap PL and Neill G. Lack of specificity for antibodies to double stranded DNA found in four commercial kits. J Clin Path. 1991; 44:246-250.
6. Brinkman K, Termaat R, Van den Brink H et al. The specificity of the anti-dsDNA ELISA: a closer look. J Immunol Methods. 1991; 13:91-100.
7. Lange A. Evaluation of the simultaneous estimation of anti-dsDNA and anti-ssDNA antibodies for clinical purposes. Clin Exp Immunol. 1978; 31: 472-481.
8. Borg EJ, Horst G, Hum EJ et al. Measurement of increases in anti-double stranded DNA antibody level as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus: a long term, prospective study. Arth Rheum. 1990; 33:634-643.
9. Feltcamp TE, Kirkwood TB et al. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. Ann Rheum Dis. 1988; 47:740-746.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 1993; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com