

EN



ImmuliTM Enhanced dsDNA Antibody ELISA

Double Stranded DNA Antibody ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUCT INSERT

REF 5120 dsDNA Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of IgG antibodies to double stranded DNA (dsDNA) in human serum, as an aid in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) in conjunction with other laboratory and clinical findings.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA) are found in various autoimmune diseases. ANA 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 disorders.¹⁻⁶ 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 disease.³⁻⁷ Antibodies to dsDNA may disappear with immunosuppressive treatment and during remission. There is a good correlation between disease activity and anti-dsDNA antibody levels.⁸ The ImmuliTM dsDNA Antibody ELISA assay detects 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 relevant.³ Results are reported in International Units (IU)/ml. Both the calibrators and positive control have been calibrated against the World Health Organization (WHO) Reference Reagent Wo/80.⁹

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with purified dsDNA antigen followed by a blocking step to reduce non-specific binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the dsDNA antigen. Unbound antibodies 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 microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the

EN

wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB 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 450 nm. Results are expressed in International Units per milliliter (IU/ml) and reported as positive or negative.

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

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.

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

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

Precautions

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 materials.¹⁰

Stop Solution is a dilute sulfuric acid solution. Sulfuric acid (H₂SO₄) is poisonous and corrosive. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes. Avoid exposure to bases, metals or other compounds that may react with acids.

TMB Enzyme Substrate contains an irritant that may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes.

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. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

ImmuliSTM dsDNA Antibody ELISA

REF 5120

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8

MICROPLATE dsDNA

Microplate with individual breakaway microwells. Coated with dsDNA antigen. Ready for use.

1 x 1.75 ml

CONTROL + dsDNA

Ready to use **Positive Control** (red cap). Contains human serum positive for dsDNA antibodies. The expected concentration range in IU/ml is printed on the label.

EN

1 x 1.75 ml		Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	 	Ready to use set of 5 Calibrators. Calibrator A (green cap) 400 IU/ml, Calibrator B (violet cap) 200 IU/ml, Calibrator C (blue cap) 100 IU/ml, Calibrator D (yellow cap) 50 IU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 IU/ml. Derived from human serum containing dsDNA antibodies. Concentrations in IU/ml are printed on the labels.
1 x 15 ml		HRP goat anti-human IgG Conjugate. Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml		Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
1 x 15 ml		TMB enzyme substrate. Ready for use. Protect from light.
1 x 15 ml		Stop Solution. Ready for use.
2 x vials		Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each.
1 x		Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60ml		Liquid concentrated Wash Buffer. Reconstitute to one liter.
----------	--	--

Symbols used on labels

	Lot number
	Catalog number
	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions before use
	Number of tests
	Manufacturer

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

EN

- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 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 per well.

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. It is recommended that frozen specimens be tested within one year.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- ***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 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to 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 Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.
- or**

EN

For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative				Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500ul** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) 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 **30 minutes** of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

EN

Quality Control

Calibrators, 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. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <30 IU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining IU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations 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

Abs. of Test Sample

----- X IU/ml of Calibrator D = IU/ml Test Sample

Abs. of Calibrator D

It is recommended that qualitative results be reported as “positive” or “negative.” Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in IU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as “positive,” “negative,” or “indeterminate” with IU/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods, as indicated in **Limitations of Procedure**.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 181 normal blood donors and non-SLE disease control specimens. The mean of the normal subjects plus 3 SD was established as the assay cutoff and assigned a value of 50 IU/ml. IMMCO suggests use of the reference range below. Each laboratory should validate assay values for their own conditions.

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

EN

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining IU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

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 indeterminate, further testing for the following is suggested:

- Antinuclear Antibodies on HEp-2 cells
- Antinuclear Antibodies on Mouse Kidney or Mouse Liver tissue sections
- Anti-ENA: RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La) Antibody ELISAs
- nDNA by indirect immunofluorescence

Above tests are available from IMMCO Diagnostics. 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 cannot necessarily rule out a diagnosis of SLE. When there is a high suspicion of SLE, then other tests, such as for ANA, ENA, nDNA and complement levels should also be considered. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis. Taken alone, these results should not be interpreted as diagnostic.

EXPECTED VALUES AND SUMMARY OF CLINICAL STUDIES

The incidence of dsDNA antibodies varies depending upon the patient population. A compilation of incidence taken from the literature appears below.^{3,7,11-13}

Disease	% Incidence
Systemic Lupus Erythematosus	50-55
Active renal disease	89
Active non-renal disease	56
Inactive disease	30
Possible SLE	32
Rheumatoid Arthritis	<12
Systemic Scleroderma	<12
Normal patients	<1

Sets of clinical samples were tested on the ImmuLisa™ dsDNA Antibody ELISA. Results demonstrating incidence in the populations are provided below:

EN

Diagnosis	No. Tested	No. Positive	% Positive*
SLE	249	155	62.2
Primary anti-phospholipid syndrome	25	0	0
Primary myositis	20	0	0
Scleroderma	4	1	25.0
Rheumatoid arthritis	43	5	11.6
Graves' disease	9	0	0
Hashimoto's thyroiditis	14	1	7.1
Undifferentiated thyroid disease	9	1	11.1
Autoimmune hearing loss	8	0	0
Normal	159	6	3.8

* Indeterminate/borderline specimens considered positive

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ dsDNA Antibody ELISA was evaluated by testing well-characterized specimens from SLE subjects with positive nDNA IFA results alongside disease controls and “normal” human sera. These specimens were also tested on commercially available ELISA kits. Only specimens in the linear range of the assay were included in the method comparison. These results are summarized below.

Immulisa™ dsDNA Antibody ELISA vs. other dsDNA antibody ELISA:

		Other dsDNA Antibody ELISA		
		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive*	71	10	81
dsDNA Ab.	Negative	6	86	92
ELISA	Total	77	96	173
Positive Percent Agreement:		92.2% (95% CI 83.2%-96.8%)		
Negative Percent Agreement:		89.6% (95% CI 81.3%-94.6%)		
Overall Percent Agreement:		90.8% (95% CI 85.2%-94.5%)		

* Indeterminate/borderline samples were considered positive.

SLE Subjects: 87

Disease Controls: 28

Healthy Normal Subjects: 58

Precision

Precision was tested with 6 specimens selected throughout the range of the assay. Runs of 6 replicates of each specimen were conducted in 12 assays. Repeatability was determined with 12 replicates of each specimen.

Sample	Mean (IU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	33.6	3.87	11.5%	4.04	11.7%	2.71	7.9%
2	41.0	4.43	10.8%	4.03	10.1%	4.08	10.2%
3	59.8	3.81	6.4%	3.83	6.6%	3.68	6.3%
4	124.9	10.31	8.3%	10.76	8.5%	5.56	4.4%
5	270.7	16.12	6.0%	16.44	5.9%	14.39	5.2%
6	361.6	24.99	6.9%	26.38	7.3%	14.72	4.1%

EN

Reproducibility

Assays of samples in the low negative range, moderate positive range and approximately +/- 20% of the assay cutoffs were performed to determine qualitative reproducibility. 86 replicates of each sample were tested. Assay results for the low negative and moderate positive specimens produced 100% qualitative agreement. Assay results for the cutoff -20% specimen produced 96.4% qualitative (negative) agreement. Assay results for the cutoff +20% specimen produced 98.8% qualitative (positive) agreement.

Linearity and Recovery

Studies were performed using equidistant dilution series of positive samples with values throughout the calibrator range to determine linear range of the assay. The linear range of the assay was determined to be from 13.6 – 450 IU/ml. Results are summarized below.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13.7 - 115.0	0.980 (0.940 - 1.019)	0.171 (-2.699 - 3.042)	1.00	96.3 - 107.1
2	14.9 - 242.3	1.031 (0.983 - 1.079)	0.835 (-6.000 - 7.667)	1.00	91.2 - 106.3
3	43.4 - 398.3	0.911 (0.874 - 0.949)	4.088 (-5.331 - 13.507)	0.998	100.0 - 112.3
4	41.7 - 332.2	0.980 (0.915 - 1.045)	9.735 (-3.518 - 22.988)	0.993	87.6 - 110.6
5	48.9 - 399.5	0.911 (0.868 - 0.954)	6.865 (-4.132 - 17.862)	0.997	97.6 - 110.8

Limit of Detection

The limit of detection (LoD) for dsDNA antibody using this assay was determined to be 13.6 IU/ml based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples.

Interference

Interference was studied by mixing sera with known dsDNA antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).

EL



ImmuliTM Enhanced dsDNA Antibody ELISA

Αντίσωμα DNA Διπλής Έλικας ELISA

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 5120 Αντίσωμα διπλής έλικας DNA (dsDNA Antibody) ELISA 96
Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG σε DNA διπλής έλικας (dsDNA) στον ανθρώπινο ορό, ως βοήθημα στη διάγνωση του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου (SLE) σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) μπορούν να βρεθούν σε διάφορες αυτοάνοσες νόσους. Τα ANA περιλαμβάνουν αντισώματα σε αντιγόνα του πυρήνα, όπως DNA, ιστόνη και διάφορα εξαγωγίμα πυρηνικά αντιγόνα, όπως RNP, Sm, SS-A και SS-B. Τρεις ιδιαίτερες συμβαίνουν με τα αντι-DNA αντισώματα.

Αυτές περιλαμβάνουν:

1. αντι-dsDNA αντισώματα που αντιδρούν μόνο με dsDNA
2. αντι-ssDNA αντισώματα που αντιδρούν με ssDNA
3. αντι-ds/ssDNA αντισώματα που αντιδρούν τόσο με dsDNA όσο και με ssDNA.

Από αυτούς τους τρεις τύπους, τα αντι-dsDNA αντισώματα είναι χαρακτηριστικά του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (SLE). Σπάνια παρατηρούνται σε άλλες αυτοάνοσες διαταραχές.¹⁻⁶ Η συχνότητα και τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων αυξομειώνονται με την δραστηριότητα της νόσου που παρατηρείται γενικά σε περίπου 50-55% των περιπτώσεων με SLE και σε περίπου 89% των ασθενών με SLE με ενεργή νεφρική νόσο.³⁻⁷ Τα αντισώματα σε dsDNA ενδέχεται να εξαφανιστούν με ανοσοκατασταλτική θεραπεία και κατά τη διάρκεια ύφεσης. Υπάρχει καλός συσχετισμός μεταξύ της δραστηριότητας της νόσου και των επιπέδων αντι-dsDNA αντισωμάτων.⁸ Η δοκιμασία ImmuliTM dsDNA Antibody ELISA ανιχνεύει dsDNA αντισώματα της κατηγορίας IgG. Επίσης παρατηρούνται αντι-DNA αντισώματα ισοτύπων IgM και IgA, αλλά αντισώματα κατηγορίας IgG έχουν παρατηρηθεί να είναι κλινικά σχετικά.³ Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε Διεθνείς Μονάδες (IU)/ml. Τόσο οι βαθμονομητές όσο και ο θετικός έλεγχος έχουν βαθμονομηθεί έναντι του Αντιδραστηρίου Αναφοράς Wo/80 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO).⁹

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία εκτελείται ως στερεά φάση ανοσοβιολογικής δοκιμασίας. Τα βυθίσματα (microwells) επενδύονται με καθαρό δίκλωνο DNA (dsDNA) και ακολουθεί το βήμα μπλοκαρίσματος για τη μείωση μη ειδικής δέσμησης κατά τη

EL

διάρκεια της διεξαγωγής της δοκιμασίας. Έλεγχοι, βαθμονομητές και οροί ασθενών επωάζονται στα επενδεδυμένα βυθίσματα αντιγόνου για να επιτραπεί σε συγκεκριμένα αντισώματα παρόντα στον ορό για να δεσμεύουν το αντιγόνο δίκλωνο DNA (dsDNA). Αδέσμευτα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού αφαιρούνται με την πλύση των βυθισμάτων. Δεσμευμένα αντισώματα ανιχνεύονται προσθέτοντας σύζευξη ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης με ενζυμική σήμανση (enzyme labeled anti-human IgG conjugate) στα βυθίσματα. Η αδέσμευτη σύζευξη απομακρύνεται με την πλύση. Συγκεκριμένο υπόστρωμα ενζύμου (TMB) προστίθεται στη συνέχεια στις κοιλότητες και η παρουσία αντισωμάτων ανιχνεύεται με χρωματική αλλαγή που παράγεται από την μετατροπή του υποστρώματος TMB σε προϊόν χρωματικής αντίδρασης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ακεραιότητα της χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη με την πυκνότητα του αντισώματος, διαβάζεται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε Διεθνείς Μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (IU/ml) και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθήκευση και Προετοιμασία

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ένζυμο παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φοράς. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, τα προερχόμενα από τον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από δοκιμασίες που απαιτούνται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.¹⁰

Το Διάλυμα Παύσης είναι διάλυμα αραιωμένου θειικού οξέως. Το θειικό οξύ (H₂SO₄) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το φάτε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Αποφύγετε την έκθεση σε βάσεις, μέταλλα ή άλλες ενώσεις που μπορεί να αντιδρούν με οξέα.

Το Υπόστρωμα Ενζύμου TMB περιέχει μια ερεθιστική ουσία που μπορεί να είναι επιβλαβής αν την εισπνεύσετε, την φάτε ή απορροφηθεί μέσω του δέρματος. Μην το φάτε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

EL

Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος κιτ για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην εναλλάσσετε στοιχεία του κιτ με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλομόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείται στοιχεία του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Υλικά που παρασχέθηκαν

ImmuliSTM dsDNA Antibody ELISA

REF 5120

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

MICROPLATE dsDNA

Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένα με αντιγόνο δίκλωνου DNA (dsDNA). Έτοιμο προς χρήση.

1 x 1.75 ml

CONTROL+ dsDNA

Έτοιμος προς χρήση **Θετικός Έλεγχος (Positive Control)** (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα dsDNA. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε IU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml

CONTROL-

Έτοιμος προς χρήση **Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control)** (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR A dsDNA

CALIBRATOR B dsDNA

CALIBRATOR C dsDNA

CALIBRATOR D dsDNA

CALIBRATOR E dsDNA

Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών. Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα) 400 IU/ml, Βαθμονομητής B (μωβ πώμα) 200 IU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 100 IU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 50 IU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 IU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα dsDNA. Συγκεντρώσεις σε IU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.

1 x 15 ml

IgG-CONJ HRP

Σύζευξη ορού ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα. (HRP goat anti-human IgG Conjugate). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.

1 x 60 ml

DIL

Αραιωτικό ορού (Serum Diluent). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με μωβ χρώμα.

1 x 15 ml

SUBSTRATE TMB

Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB enzyme substrate). Έτοιμο προς χρήση. **Προστατέψτε από το φως.**

1 x 15 ml

STOP H₂SO₄

Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμο προς χρήση.

2 x vials

BUF WASH

Διάλυμα Πλύσης σε μορφή Σκόνης (Powder Wash Buffer). **Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο έκαστο.**

1 x

Φύλλα Πρωτοκόλλου









Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60ml

BUF WASH

Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

	Αριθμός Παρτίδας
	Αριθμός καταλόγου
	Διαγνωστική χρήση in vitro
	Χρήση έως
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπέτων (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την ανάγνωση τιμών απορροφητικότητας στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος αναγνώστης μικροπλάκας διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να οριστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο microplate ικανό 200 μl ανά καλά

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**Διαδικαστικές Σημειώσεις**

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.

EL

- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια δοκιμασίας να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Προτείνεται τα αντιδραστήρια να παραμείνουν στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν τη χρήση. Βάζετε πίσω όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρείτε τις απαιτούμενες λωρίδες βυθισμάτων από τη σακούλα και προσεκτικά σφραγίζετε ξανά τη σακούλα για να αποφύγετε υγραποίηση στα μη χρησιμοποιηθέντα βυθίσματα. Βάζετε τη σακούλα πίσω στο ψυγείο αμέσως.
- **H τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Αν η πλύση εκτελείται με το χέρι, η σωστή πλύση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας δυνατή ροή διαλύματος πλύσης με φιάλη πλύσης με ανοιχτό στόμιο σε ολόκληρη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.**
- Χρησιμοποιείτε πολυκάναλη πιπέτα ικανή να απελευθερώνει 8 ή 12 κοιλότητες ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει χρόνους πιο ομοιόμορφης επώασης.
- Σε όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος χρονισμού είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης γίνεται με την ολοκλήρωση της προσθήκης αντιδραστηρίου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και την ίδια ακολουθία.

Μέθοδος Δοκιμής

Βήμα 1 Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 2 Τοποθετείτε ετικέτα στο φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση δείγματος στις κοιλότητες. Αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική να εκτελείτε τα δείγματα εις διπλούν.

Βήμα 3 Για **Ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο Βαθμονομητή Δ (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα).

ή

Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε Βαθμονομητές Α έως Ε, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διάταξη δείγματος.

	Ποιοτικός		
A	Κενός	S5	Κ.λπ.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

	Ημι-Ποσοτικός		
A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

EL

- Βήμα 4** Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500ul** Ορού Αραίωσης.
- Βήμα 5** Αφαιρείτε τα απαιτούμενα βυθίσματα από το σάκο και βάζετε πίσω τις λωρίδες που δεν έχετε χρησιμοποιήσει στη σφραγισμένη σακούλα στο ψυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.
- Βήμα 6** Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** τους Έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές, τους Θετικούς και Αρνητικούς ελέγχους και τα αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στα κατάλληλα βυθίσματα σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλλου.
- Σημείωση:** Συμπεριλαμβάνετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίζετε την συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστηρίου.
- Βήμα 7** Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Πλένετε **4 φορές** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίζετε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάξτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κοιλότητα. Για να κάνετε αποτύπωση στο τέλος της τελευταίας πλύσης, αναστρέψτε τις λωρίδες και κτυπήστε τοις κοιλότητες έντονα πάνω σε απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες. Για αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Βάζετε με την πιπέτα **100 μl** της σύζευξης σε βυθίσματα.
- Βήμα 10** Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Πλένετε όλα τα βυθίσματα, όπως περιγράφεται στο Βήμα 8.
- Βήμα 12** Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για τη Σύζευξη.
- Βήμα 13** Επωάζετε για **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Διαλύματος Παύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του Ενζυμικού Υποστρώματος. Διαβάζετε τις τιμές απορροφητικότητας εντός 30 λεπτών από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βυθίσματος σε **450 nm** χρησιμοποιώντας μονού ή στα 450/630nm χρησιμοποιώντας διπλού μήκους κύματος συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας έναντι του σετ κενού αντιδραστηρίου σε μηδενική απορροφητικότητα.

Ποιοτικός Έλεγχος

Οι Βαθμονομητές, ο Θετικός και Αρνητικός Έλεγχος και ένα κενό αντιδραστήριο πρέπει να εκτελούνται με κάθε δοκιμασία για την εξακρίβωση της ακεραιότητας και ακριβείας της δοκιμασίας. Η ένδειξη απορροφητικότητας του κενού αντιδραστηρίου θα πρέπει να είναι μικρότερη του 0,3. Ο Βαθμονομητής A θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 1,0, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να είναι

EL

μικρότερος από 30 IU/ml. Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, ο μέσος όρος των δύο ενδείξεων θα πρέπει να λαμβάνεται για τον προσδιορισμό IU/ml. Κατά την εκτέλεση των Ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνην του αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς ο θετικός έλεγχος πρέπει να δίνει τιμές εντός του φάσματος που δηλώνεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

----- X IU/ml Βαθμονομητή Δ =IU/ml Δείγμα Δοκιμασίας

Απορ. Βαθμονομητή Δ

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε IU/ml στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας IU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους, όπως δηλώνεται στους **Περιορισμούς Διαδικασίας**.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 181 απλών δοτών αίματος και δείγματα ελέγχου μη-SLE νόσου. Ο μέσος όρος των συνήθων αντικειμένων συν 3 SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας και καθόρισε την τιμή των 50 IU/ml. Η IMMCO προτείνει τη χρήση του παρακάτω εύρους αναφοράς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώνει τις τιμές δοκιμασίας για τις δικές τους συνθήκες.

τιμή dsDNA Ab	Ερμηνεία
<50 IU/ml	Αρνητικό
50-60 IU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>60 IU/ml	Θετικό

Βαθμονομητής

Οι Έτοιμοι προς Χρήση Βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να παρέχουν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορούν να δώσουν τιμές απορροφητικότητας μεγαλύτερες από εκείνη του Βαθμονομητή Α. Για τον προσδιορισμό ακριβών ημι-ποσοτικών τιμών, αυτά τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω ώστε να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης του βαθμονομητή όταν επανεξετάζονται. Για τον προσδιορισμό τιμών IU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που αποκτήθηκαν με τον διαλύτη.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Πολυπλοκότητα κατά CLIA: Υψηλή. CDC Κωδικός Εξακρίβωσης Αναλυτών: 0425. CDC Κωδικός Εξακρίβωσης Συστήματος Δοκιμής: 28276.

Η δοκιμασία δεν θα πρέπει να εκτελείται σε αιμολυμένα, βακτηριδιακά επιμολυσμένα ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δειγμάτων ανθρώπινου ορού μόνον. Όταν τα αποτελέσματα δοκιμής είναι απροσδιόριστα, περαιτέρω έλεγχος για τα ακόλουθα προτείνεται:

- Αντιπυρηνικά Αντισώματα σε HEp-2 κύτταρα
- Αντιπυρηνικά Αντισώματα σε τμήματα Νεφρού Ποντικίου ή ιστού Ήπατος Ποντικίου
- Αντι-ENA: RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La) Antibody ELISAs
- nDNA από έμμεσο ανοσοφθορισμό

Οι ως άνω δοκιμές διατίθενται από την IMMCO Diagnostics. Ανατρέξτε στον Κατάλογο Προϊόντων.

Επίσης προτείνεται ο έλεγχος για συμπληρωματικά επίπεδα C3 και C4, CH50 και ανοσοσυμπλέγματα. Πολύ θετικά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της SLE. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα δεν μπορούν απαραίτητα να αποκρύψουν μια διάγνωση SLE. Όταν υπάρχει υψηλή υποψία για SLE, τότε άλλες δοκιμές, όπως για ANA, ENA, nDNA και συμπληρωματικά επίπεδα θα πρέπει να εξετάζεται. Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν εξυπηρετούν μόνο ως βοήθημα στη διάγνωση. Μόνα τους, αυτά τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως διαγνωστικά.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Η επίπτωση dsDNA αντισωμάτων ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό ασθενών. Η συλλογή επίπτωσης που ελήφθη από τη βιβλιογραφία εμφανίζεται κατωτέρω.^{3,7,11-13}

EL

Νόσος	% Περιστατικού
Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος	50-55
Ενεργής νεφρική νόσος	89
Ενεργής εξωνεφρική νόσος	56
Αδρανής νόσος	30
Πιθανός SLE	32
ρευματοειδής Αρθρίτιδα	<12
Συστηματική σκληροδερμία	<12
Συνήθεις ασθενείς	<1

Σετ κλινικών δειγμάτων δοκιμάστηκαν στο ImmuLISA™ dsDNA Antibody ELISA. Τα αποτελέσματα που καταδεικνύουν επίπτωση στους πληθυσμούς παρέχονται κατωτέρω:

<u>Διάγνωση</u>	<u>Αρ. Δοκιμασμ.</u>	<u>Αρ. Θετ.</u>	<u>% Θετ.*</u>
Συστηματικός ερυθματώδης λύκος	249	155	62,2
Πρωτοπαθές σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων	25	0	0
Πρωτοπαθής μωσσίτιδα	20	0	0
Σκληροδερμία	4	1	25,0
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	43	5	11,6
Νόσος Graves	9	0	0
Θυρεοειδίτιδα Χασιμότο	14	1	7,1
Αδιαφοροποίητη νόσος θυρεοειδούς	9	1	11,1
Αυτοάνοση απώλεια ακοής	8	0	0
Φυσιολογική	159	6	3,8

* Τα απροσδιόριστα/οριακά δείγματα θεωρούνται θετικά

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα του ImmuLISA™ dsDNA Antibody ELISA αξιολογήθηκε με δοκιμή καλώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων από SLE υποκείμενα με θετικά nDNA IFA αποτελέσματα μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA. Μόνον δείγματα στο γραμμικό εύρος της δοκιμασίας συμπεριελήφθησαν στη μέθοδο σύγκρισης. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

ImmuLISA™ dsDNA Antibody ELISA έναντι dsDNA antibody ELISA:

		Άλλο dsDNA Antibody ELISA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	71	10	81
dsDNA	Αρνητικό	6	86	92
ELISA	Σύνολο	77	96	173
Συμφωνία Θετικού Ποσοστού:		92,2% (95% CI 83,2% - 96,8%)		
Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού:		89,6% (95% CI 81,3% - 94,6%)		
Συμφωνία Γενικού ποσοστού:		90,8% (95% CI 85,2% - 94,5%)		

SLE Υποκείμενα: 87

Έλεγχοι Νόσων: 28

Υγιή Συνήθη Υποκείμενα: 58

ΕΛ

Ακρίβεια

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με 6 θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Σειρές δοκιμασιών τριών επαναλήψεων πειράματος (replicates) διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα σε 12 δοκιμασίες. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 12 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Δείγμα	Μέσος όρος (IU/ml)	Ολική Ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	33,6	3,87	11,5%	4,04	11,7%	2,71	7,9%
2	41,0	4,43	10,8%	4,03	10,1%	4,08	10,2%
3	59,8	3,81	6,4%	3,83	6,6%	3,68	6,3%
4	124,9	10,31	8,3%	10,76	8,5%	5,56	4,4%
5	270,7	16,12	6,0%	16,44	5,9%	14,39	5,2%
6	361,6	24,99	6,9%	26,38	7,3%	14,72	4,1%

Αναπαραγωγιμότητα

Δοκιμασίες δειγμάτων στο χαμηλό αρνητικό εύρος, μέτρια θετικό εύρος και περίπου +/- 20% των σημείων διαχωρισμού της δοκιμασίας εκτελέστηκαν για να προσδιορίσουν ποιοτική αναπαραγωγιμότητα. 86 πανομοιότυπα κάθε δείγματος δοκιμάστηκαν. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας για τα χαμηλά αρνητικά και μέτρια θετικά δείγματα παρήγαν 100% ποιοτική συμφωνία. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας για το σημείο διαχωρισμού -20% παρήγαν 96.4% ποιοτική (αρνητική) συμφωνία.

Γραμμικότητα και Ανάκαμψη

Εκτελέστηκαν μελέτες με τη χρήση ισαπέχουσας αραίωσης σειράς θετικών δειγμάτων με τιμές σε όλο το εύρος του βαθμονομητή για να προσδιορίσει το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας. Το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας προσδιορίστηκε ότι θα είναι από 13,6 – 450 IU/ml.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13,7 - 115,0	0,980 (0,940 - 1,019)	0,171 (-2,699 - 3,042)	1,00	96,3 - 107,1
2	14,9 - 242,3	1,031 (0,983 - 1,079)	0,835 (-6,000 - 7,667)	1,00	91,2 - 106,3
3	43,4 - 398,3	0,911 (0,874 - 0,949)	4,088 (-5,331 - 13,507)	0,998	100,0 - 112,3
4	41,7 - 332,2	0,980 (0,915 - 1,045)	9,735 (-3,518 - 22,988)	0,993	87,6 - 110,6
5	48,9 - 399,5	0,911 (0,868 - 0,954)	6,865 (-4,132 - 17,862)	0,997	97,6 - 110,8

EL

Όριο Ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) για dsDNA αντίσωμα με χρήση αυτής της δοκιμασίας καθορίστηκε να είναι 13,6 IU/ml επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS).

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα dsDNA αντισωμάτων με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).

ES



ImmuliTM Enhanced ADNdc Antibody ELISA

ELISA Anticuerpos ADN doble cadena

IVD

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF 5120 ELISA Anticuerpos ADNdc 96 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección y la semi-cuantificación de anticuerpos IgG en ADN doble cadena (ADNdc) en el suero humano, como ayuda para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES) en conjunto con otras pruebas clínicas y de laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antinucleares (AAN) están presentes en varias enfermedades autoinmunes. Los AAN incluyen anticuerpos de antígenos del núcleo como ADN, histona y varios antígenos nucleares extraíbles como RNP, Sm, SS-A y SS-B. Con los anticuerpos antiADN tienen lugar tres especificidades:

A saber:

1. anticuerpos anti ADN^{dc} que reaccionan sólo con ADN^{dc}
2. anticuerpos anti ADN^{cs} que reaccionan con ADN^{cs}
3. anticuerpos anti ADN^{dc/cs} que reaccionan tanto con ADN^{dc} y ADN^{cs}.

De estos tres tipos, los anticuerpos anti ADNdc son característicos del lupus eritematoso sistémico (LES). Raramente se presentan en otras enfermedades autoinmunes.¹⁻⁶ La frecuencia y los niveles de estos anticuerpos fluctúan con la actividad de la enfermedad presentándose en aproximadamente un 50-55% de los casos de LES y en aproximadamente el 89% de los pacientes de LES con enfermedades renales activas.³⁻⁷ Los anticuerpos de ADNdc podrían desaparecer con tratamientos inmunosupresores y durante la remisión. Existe una importante correlación entre la actividad de la enfermedad y los niveles de anticuerpos anti ADNdc.⁸ El ensayo ELISA ImmuliTM de anticuerpos ADNdc detecta los anticuerpos ADNdc de tipo IgG. También se presentan anticuerpos anti ADN de los isotipos IgM e IgA, pero los anticuerpos de clase IgG han demostrado ser clínicamente relevantes.³ Los resultados se presentan en unidades internacionales (IU)/ml. Tanto los calibradores como el control positivo han sido calibrados con el Reactivo de Referencia Wo/80 de la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁹

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es realizado como un inmunoensayo de fase sólida. Los micropocillos son recubiertos con antígeno ADNdc purificado y a continuación se realiza una fase de bloqueo para reducir los vínculos no específicos durante el ensayo. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y el suero del paciente para que los anticuerpos específicos puedan presentarse en

ES

el suero para unirse al antígeno ADNdc. Los anticuerpos separados y otras proteínas del suero son eliminados lavando los micropocillos. Se detectan los anticuerpos unidos añadiendo a los micropocillos una enzima etiquetada conjugado anti-humano IgG. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados son expresados en unidades internacionales por milímetro (IU/ml) y consignados como positivos o negativos.

REACTIVOS

Almacenamiento y preparación

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.¹⁰

La solución de parada es una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico (H₂SO₄) es venenoso y corrosivo. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos. Evite exponerlo a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con ácidos.

El sustrato de enzima TMB contiene un irritante que puede resultar nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos.

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

ES

Materiales proporcionados

ELISA ImmuLisa™ Anticuerpos ADNdc **REF** 5120

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Micropalaca con micropocillos individuales escindibles. Revestida con antígeno ADNdc. Lista para su utilización.
1 x 1.75 ml	CONTROL + dsDNA	Control Positivo listo para su utilización (<i>tapón rojo</i>). Contiene suero humano positivo en anticuerpos ADNdc. El registro de concentración esperado en IU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Control Negativo listo para su utilización (<i>tapón blanco</i>). Contiene suero humano.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A dsDNA CALIBRATOR B dsDNA CALIBRATOR C dsDNA CALIBRATOR D dsDNA CALIBRATOR E dsDNA	Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (tapón verde) 400 IU/ml, Calibrador B (tapón violeta) 200 IU/ml, Calibrador C (tapón azul) 100 IU/ml, Calibrador D (tapón amarillo) 50 IU/ml, y Calibrador E (tapón naranja) 1 IU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos ADNdc. Las concentraciones en IU/ml están impresas en las etiquetas.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado IgG antihumano de cabra HRP. Lista para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color púrpura.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. Proteger de la luz.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solución de parada. Lista para su utilización.
2 x vials	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir a un litro cada uno.
1 x		Hojas de protocolo

Componentes opcionales

1 x 60ml	BUF WASH	Tampón de lavado líquido concentrado. Reconstituir a un litro.
----------	------------------	---

ES

Símbolos utilizados en las etiquetas



Número de lote



Número de catálogo



Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Leer las instrucciones antes de utilizar



Número de análisis



Fabricante

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Arandela automática del microplate capaz de dispensar el µl 200 por pozo

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Le sugerimos que deje los reactivos sobre la mesa de trabajo y fuera de la caja unos 30 minutos antes de su utilización. Vuelva a meter

ES

todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.

- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- **Una buena técnica de lavado es fundamental.** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. **Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.**
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

Método de análisis

Paso 1 Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.

Paso 2 Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

o

Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

Cualitativo				Semi-cuantitativo			
A	Base	S5	Etc.	A	Base	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Paso 4 Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500µl** de Diluyente de Suero.

Paso 5 Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.

ES

Paso 6 Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.

Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.

Paso 7 Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 8 Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.

Paso 9 Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.

Paso 10 Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 11 Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.

Paso 12 Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.

Paso 13 Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 14 Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.

Paso 15 Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser $<0,3$. El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <30 IU/ml. Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura en IU/ml. Al realizar determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semicuantitativas el control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

----- X IU/ml de Calibrador D = IU/ml Muestra Análisis

Abs. de Calibrador D

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son “positivos” o “negativos”. Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbencia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en IU/ml en el eje X y la absorbencia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son “positivos”, “negativos” o “indeterminados” con valores en unidades IU/ml. Los resultados indeterminados/en el límite deberían ser reanalizados y evaluados junto con otros métodos de laboratorio, tal como se indica en **Limitaciones del procedimiento.**

Interpretación

Los valores de interpretación fueron determinados analizando 181 especímenes de control de donantes de sangre normales y sin LES. La media de los sujetos normales más 3 SD fue establecida como límite del ensayo y se le asignó un valor de 50 IU/ml. IMMCO recomienda la utilización del registro de referencia siguiente. Cada laboratorio debería validar los valores del ensayo para sus propias condiciones.

Valor ADNc Ab	Interpretación
<50 IU/ml	Negativo
50-60 IU/ml	Indeterminado (Límite)
>60 IU/ml	Positivo

Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbencia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en IU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

ES

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Complejidad CLIA Alta. CDC Código identificación analito: 0425. CDC Código identificación sistema análisis: 28276.

El ensayo no debería ser realizado en muestras muy hemolizadas, con contaminación microbiana o lipémicas. Este método debería ser utilizado únicamente para analizar muestras de suero humano. Cuando los resultados de los análisis son indeterminados, sugerimos la realización de más análisis de lo siguiente:

- Anticuerpos antinucleares en células HEp-2
- Anticuerpos antinucleares en secciones de riñón de ratón y hígado de ratón
- Anti-ENA: ELISA Anticuerpo RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La)
- ADN nuclear por inmunofluorescencia indirecta

Los análisis anteriores están disponibles en IMMCO Diagnostics. Consulte el catálogo de productos.

Para analizar los niveles de complementos C3 y C4, también sugerimos los complejos inmunes y CH50. Unos resultados positivos claros son indicadores de LES. Sin embargo, unos resultados negativos no descartan necesariamente un diagnóstico de LES. Cuando existen claros indicios de LES deberían considerarse también otros análisis, como ANA, ENA, ADN nuclear y niveles complementarios. Los resultados obtenidos solo sirven como ayuda en el diagnóstico. Independientemente, estos resultados no deberían ser interpretados como diagnósticos.

VALORES ESPERADOS Y RESUMEN DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

La incidencia de anticuerpos ADNdc varía en función del paciente. A continuación incluimos un resumen de la incidencia realizado a partir de la documentación.^{3,7,11-13}

Enfermedad	% Incidencia
Lupus Eritematoso Sistémico	50-55
Enfermedad renal activa	89
Enfermedad no renal activa	56
Enfermedad inactiva	30
Posible LES	32
Artritis reumatoide	<12
Escleroderma sistémica	<12
Pacientes normales	<1

Los sistemas de muestras clínicas de pacientes con el ELISA ImmuLisa™ para los anticuerpos de ADNdc eran analizados. A continuación mostramos resultados que demuestran la incidencia en la población:

ES

Diagnosis	Cantidad analiz.	Cantidad pos.	% Positivo*
LES	249	155	62,2
Síndrome antifosfolípido primario	25	0	0
Miositis primaria	20	0	0
Esclerodermia	4	1	25,0
Artritis reumatoide	43	5	11,6
Enfermedad de Graves	9	0	0
Tiroiditis de Hashimoto	14	1	7,1
Enfermedad tiroidea no diferenciada	9	1	11,1
Pérdida de oído autoinmune	8	0	0
Normal	159	6	3,8

* Los especímenes indeterminados/dudosos son considerados positivos

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA ImmuLisa™ para anticuerpos ADNdc fue evaluada analizando especímenes característicos de pacientes de LES con resultados IFA positivos de ADN nuclear junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con equipos ELISA disponibles comercialmente. Sólo se incluyeron en la comparación los especímenes del registro lineal del ensayo. Los resultados se resumen a continuación.

ELISA ImmuLisa™ anticuerpos ADNdc vs. Otros ELISA anticuerpos ADNdc:

		Otro ELISA Anticuerpos ADNdc		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	71	10	81
ADNdc	Negativo	6	86	92
ELISA	Total	77	96	173

Concordancia de porcentaje positivo: 92,2% (95% CI 83,2% - 96,8%)

Concordancia de porcentaje negativo: 89,6% (95% CI 81,3% - 94,6%)

Concordancia de porcentaje total: 90,8% (95% CI 85,2% - 94,5%)

Pacientes LES: 87

Controles de enfermedades: 28

Sujetos normales sanos: 58

Precisión

La precisión fue analizada con 6 especímenes positivos seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron análisis de seis muestras duplicadas de cada espécimen en 12 ensayos. La repetibilidad fue determinada con 12 muestras duplicadas de cada espécimen.

Muestra	Media (IU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	33,6	3,87	11,5%	4,04	11,7%	2,71	7,9%
2	41,0	4,43	10,8%	4,03	10,1%	4,08	10,2%
3	59,8	3,81	6,4%	3,83	6,6%	3,68	6,3%
4	124,9	10,31	8,3%	10,76	8,5%	5,56	4,4%
5	270,7	16,12	6,0%	16,44	5,9%	14,39	5,2%
6	361,6	24,99	6,9%	26,38	7,3%	14,72	4,1%

Reproducibilidad

Se realizaron análisis de muestras en el ámbito negativo bajo, positivo moderado y aproximadamente +/- 20% de los límites de ensayo para determinar la reproducibilidad cualitativa. Se analizaron 86 duplicados de cada muestra. Los resultados del ensayo para los especímenes negativo bajo y positivo moderado produjeron un acuerdo cualitativo del 100%. Los resultados del ensayo para el espécimen límite -20% produjeron un acuerdo cualitativo del 96,4% (negativo). Los resultados del ensayo para el espécimen límite +20% produjeron un acuerdo cualitativo del 98,8% (positivo).

Linealidad y recuperación

Se realizaron estudios utilizando series de dilución equidistantes de muestras positivas con valores de todo el ámbito del calibrador para determinar el ámbito lineal del ensayo. Se determinó que el ámbito lineal del ensayo era de 13,6 – 450 IU/ml. Los resultados se resumen a continuación.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13,7 - 115,0	0,980 (0,940 - 1,019)	0,171 (-2,699 - 3,042)	1,00	96,3 - 107,1
2	14,9 - 242,3	1,031 (0,983 - 1,079)	0,835 (-6,000 - 7,667)	1,00	91,2 - 106,3
3	43,4 - 398,3	0,911 (0,874 - 0,949)	4,088 (-5,331 - 13,507)	0,998	100,0 - 112,3
4	41,7 - 332,2	0,980 (0,915 - 1,045)	9,735 (-3,518 - 22,988)	0,993	87,6 - 110,6
5	48,9 - 399,5	0,911 (0,868 - 0,954)	6,865 (-4,132 - 17,862)	0,997	97,6 - 110,8

Límite de detección

Se calculó que el límite de detección (LD) para anticuerpos ADNdc utilizando este ensayo era de 13,6IU/ml en base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS).

ES

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos ADNdc conocidos con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 $\mu\text{mol/L}$), y Factor Reumatoide (100 EU/ml).

DE



Immuliisa™ Enhanced dsDNA Antibody ELISA

Doppelsträngiger DNA-Antikörper ELISA

IVD

PRODUKTBEILAGE

REF 5120 dsDNA-Antikörper ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) für die Erfassung und Halbquantifizierung von IgG Antikörpern zur doppelsträngigen DNA (dsDNA) im Humanserum, als eine Arbeitshilfe in der Diagnose des systemischen Lupus erythematodes (SLE) in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) sind in verschiedenen Autoimmunerkrankungen zu finden. ANA umfasst Antikörper zu Antigenen des Zellkerns wie z. B. zur DNA, dem Histon und den verschiedenen extrahierbaren Kernantigenen wie z. B. RNP, Sm, SS-A und SS-H. Drei Spezifitäten treten mit Anti-DNA-Antikörpern auf.

Diese schließen ein:

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 Typen sind Anti-dsDNA-Antikörper vom systemischen Lupus erythematodes (SLE) charakteristisch. Sie treten selten bei anderen Autoimmunerkrankungen auf.¹⁻⁶ Die Häufigkeit und Spiegel dieser Antikörper schwanken mit der Krankheitsaktivität, die insgesamt in ungefähr 50-55 % von SLE-Fällen und in ungefähr 89 % von SLE-Patienten mit aktiver Nierenerkrankung auftritt.³⁻⁷ Antikörper zu dsDNA können mit der immunsuppressiven Behandlung und während der Remission verschwinden. Es gibt eine gute Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Anti-dsDNA-Antikörperspiegeln.⁸ Die Immuliisa™ dsDNA-Antikörper-ELISA-Prüfung erkennt dsDNA-Antikörper der IgG-Klasse. Anti-dNA-Antikörper von IgM- und IgA-Isotypen treten auch auf, aber IgG-Klassen-Antikörper haben sich als klinisch relevant erwiesen.³ Resultate werden in Internationalen Einheiten (IU)/ml berichtet. Sowohl die Kalibratoren als auch die Positivkontrolle sind gegen die Weltgesundheitsorganisations-(WHO)-Referenz Reagenz Wo/80⁹ abgeglichen worden.

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Der Test wird als ein Festphasenimmunoassay ausgeführt. Mikrovertiefungen werden mit dem von einem Blockierungsschritt gefolgt gereinigten dsDNA-Antigen beschichtet, um eine nichtspezifische Protein-Bindung während des Prüfungsablaufs zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenseren

DE

werden in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen inkubiert, um im Serum vorhandenen spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, sich an das dsDNA-Antigen zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serum-Proteine werden durch Waschen der Mikrovertiefungen entfernt. Bestimmte Antikörper werden durch Hinzufügen von einem enzymmarkierten anti-menschlichen IgG-Konjugat zu den Mikrovertiefungen erkannt. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Spezifisches Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch einen Farbwechsel, erzeugt durch die Umwandlung des TMB-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt, erkannt. Die Reaktion wird gestoppt und die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, wird durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Die Resultate werden in Internationalen-Einheiten pro Milliliter (IU/ml) ausgedrückt und als positiv oder negativ berichtet.

REAGENZIEN

Lagerung und Vorbereitung

Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie es nicht, wenn das Reagenz nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch (20-25°C) auf Raumtemperatur gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Beutel, der Trocknungsmittel enthält, sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8 °C gelagert werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Komponenten sind auf HBsAg, HCV, HIV 1 und 2 und HTLV-I geprüft und durch erforderliche Tests anhand FDA als negativ festgestellt worden. Menschliche Blutderivate und Patientenproben sollten jedoch als potenziell ansteckend betrachtet werden. Gute Laborpraktiken bei der Lagerung, beim Abgeben und dem Entsorgen dieser Materialien befolgen.¹⁰

Die Stopplösung ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H₂SO₄) ist giftig und ätzend. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Die Exponierung gegenüber Basen, Metallen oder anderen Verbindungen vermeiden, die mit Säuren reagieren können. TMB-Enzymsubstrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann, wenn er eingeatmet, aufgenommen oder durch die Haut absorbiert wird. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden.

DE

Die Anweisungen wie sie in dieser Kit-Beilage angegeben sind sollten genau befolgt werden, um gültige Resultate sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Gute Laborpraktiken befolgen, um mikrobiische und Querkontamination von Reagenzien beim Handling zu minimieren. Verwenden Sie die Kit-Komponenten nicht über das auf den Etiketten angegebene Ablaufdatum hinaus.

Bereitgestellte Materialien

ImmuLISA™ dsDNA-Antikörper-ELISA

REF 5120

Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

12 x 8

MICROPLATE dsDNA

Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit dsDNA-Antigen. Gebrauchsfertig.

1 x 1.75 ml

CONTROL+ dsDNA

Einsatzbereite **Positivkontrolle** (roter Verschlussdeckel). Enthält Humanserum positiv für dsDNA-Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in IU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.

1 x 1.75 ml

CONTROL-

Einsatzbereite **Negativkontrolle** (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR A dsDNA

CALIBRATOR B dsDNA

CALIBRATOR C dsDNA

CALIBRATOR D dsDNA

CALIBRATOR E dsDNA

Einsatzbereiter Satz von 5 Kalibratoren. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 400 IU/ml, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 200 IU/ml, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 100 IU/ml, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 50 IU/ml und Kalibrator E (orangener Verschlussdeckel) 1 IU/ml. Abgeleitet von Humanserum, das dsDNA-Antikörper enthält. Konzentrationen in IU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.

1 x 15 ml

IgG-CONJ HRP

HRP Ziege anti-menschliches Konjugat. Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.

1 x 60 ml

DIL

Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbcode lila.

1 x 15 ml

SUBSTRATE TMB

TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. **Vor Licht schützen.**

1 x 15 ml

STOP H₂SO₄

Stop-Lösung. Gebrauchsfertig.

2 x vials

BUF WASH

Pulver-Waschpuffer. **Zu je einem Liter wiederherstellen.**

1 x

Protokollblätter

Optionale Komponenten









1 x 60ml

BUF WASH

Flüssigkeit konzentrierter Waschpuffer. Zu einem Liter herstellen.

DE

Auf Etiketten verwendete Symbole

	Chargennummer
	Katalognummer
	Für in vitro diagnostischen Gebrauch
	Gebrauchen bei
	Lagertemperatur
	Die Anleitung vor dem Gebrauch durchlesen
	Anzahl an Tests
	Hersteller

Erforderliche Aber Nicht Bereitgestellte Materialien

- Entsalztes oder destilliertes Wasser
- Quetschflasche, um verdünnten Waschpuffer aufzunehmen
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Einwegpipettenspitzen
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Reagenzglasgestell
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher
- Mikroplattenleser, fähig Absorptionswerte bei 450 nm abzulesen. Wenn ein Zweiwellenlängen-Mikroplattenleser verfügbar ist, sollte der Referenzfilter bei 600-650 nm eingestellt werden
- Automatische microplate Unterlegscheibe fähig zum Zuführen von µl 200 pro Brunnen

PROBENENTNAHME UND HANDLING

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Grob hämolisierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8°C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden. Es wird empfohlen, dass eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres geprüft werden.

VERFAHREN

Verfahrenshinweise

- Die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durchlesen.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor dem Beginn der Untersuchung vorbereitet werden.
- Die Patientenproben und Testreagenzien auf Raumtemperatur bringen, bevor mit dem Prüfverfahren begonnen wird. Es wird empfohlen, dass Reagenzien vor dem Gebrauch auf dem Labortisch außerhalb des Kastens für 30 Minuten verbleiben. Alle ungebrauchten Proben und Reagenzien sofort nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank stellen.

DE

- Erforderliche Mikrovertiefungsstreifen aus dem Beutel entnehmen und den Beutel sorgfältig wieder versiegeln, um Kondensation in den ungebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank stellen.
- **Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.** Bei manuellem Waschen, wird adäquates Waschen dadurch erreicht, dass ein kräftiger Waschpufferstrom mit einer breitspitzigen Spritzflasche über die komplette Mikroplatte gerichtet wird. **Ein automatisierter Mikroplattenwascher wird empfohlen.**
- Eine Mehrkanalpipette verwenden, die 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig versorgen kann. Das beschleunigt den Prozess und ermöglicht einheitlichere Inkubationszeiten.
- Bei allen Schritten ist die sorgfältige Kontrolle der Zeitmessung wichtig. Der Start aller Inkubationszeiten beginnt mit der Beendigung der Reagenzzugabe.
- Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte bei der gleichen Geschwindigkeit und in der gleichen Reihenfolge ausgeführt werden.

Prüfmethode

Schritt 1 Alle Reagenzien und Proben bei Raumtemperatur ins Gleichgewicht bringen.

Schritt 2 Das Protokollblatt kennzeichnen, um die Probenanordnung in den Vertiefungen anzuzeigen. Es ist gute Laborpraktik, mit einer zweifachen Ausführung der Proben zu arbeiten.

Schritt 3 Für eine **qualitative Bestimmung** nur den Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) verwenden.

oder

Für eine **semiquantitative Bestimmung** die Kalibratoren A bis E, wie im nachfolgenden Proben-Layout verwenden.

	Qualitativ			Semiquantitativ			
A	Leerprobe	S5	usw.	A	Leerprobe	S1	usw.
B	-Kontrolle	S6		B	-Kontrolle	S2	
C	+ Kontrolle	S7		C	+ Kontrolle	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Schritt 4 **1:101** Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenserum mit **500 µl** des Serumverdünnungsmittels vorbereiten.

Schritt 5 Die erforderlichen Mikrovertiefungen aus dem Beutel entnehmen und ungebrauchte Streifen im versiegelten Beutel wieder zurück in den Kühlschrank stellen. Die Mikrovertiefungen sicher im extra bereitgestellten Halter platzieren.

DE

- Schritt 6** Mit der Pipette **100 µl** von einsatzbereiten Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und verdünnte Patientenproben (**1:101**) gemäß dem Protokollblatt in die zugehörigen Mikrovertiefungen geben.
Hinweis: Eine Vertiefung, die **100 µl** an Serumverdünnungsmittel enthält, als eine Reagenz-Leerprobe einschließen. Den ELISA-Leser gegen die Reagenz-Leerprobe nullen.
- Schritt 7** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 8** **4x** mit dem Waschpuffer waschen. Um manuell zu Waschen, füllen Sie jede Mikrovertiefung mit dem wiederhergestellten Waschpuffer. Die Flüssigkeit durch Umkehren und Ausklopfen des Inhalts jeder Vertiefung oder durch Ansaugen der Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entsorgen. Die Streifen umkehren und die Vertiefungen kräftig auf saugfähigen Papierhandtüchern ausklopfen, um am Ende des letzten Waschens zu blotten. Bei einer automatischen Wascheinrichtung programmieren Sie diese gemäß den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Mit der Pipette **100 µl** des Konjugats in die Mikrovertiefungen geben.
- Schritt 10** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 11** Alle Mikrovertiefungen wie in Schritt 8 waschen.
- Schritt 12** Mit der Pipette **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Mikrovertiefung in der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für das Konjugat zugeben.
- Schritt 13** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 14** Mit der Pipette **100 µl** der Stopp-Lösung in jede Mikrovertiefung unter Verwendung der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für die Zugabe des Enzymsubstrats zugeben. Die Absorptionswerte innerhalb von **30 Minuten** nach Hinzufügen der Stopp-Lösung ablesen.
- Schritt 15** Die Absorption jeder Mikrovertiefung bei **450 nm** unter Verwendung eines Ein- oder bei 450/630 nm unter Verwendung eines Zweiwellenlängen-Mikroplattenlesers gegen die auf Null-Absorption gesetzte Reagenz-Leerprobe ablesen.

Qualitätskontrolle

Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und eine Reagenz-Leerprobe müssen mit jeder Prüfung eingesetzt werden, um die Vollständigkeit und Genauigkeit des Tests zu verifizieren. Die Absorptionsanzeige der Reagenz-Leerprobe sollte <0,3 sein. Der Kalibrator A sollte eine Absorptionsanzeige von nicht weniger als 1,0 haben, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <30 IU/ml sein. Wenn der Test als zweifache Ausführung durchgeführt wird, sollte der Mittelwert der zwei Messdaten aufgenommen werden, um IU/ml zu bestimmen. Beim Durchführen von Qualitativen Bestimmungen muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Für semiquantitative Bestimmungen muss die Positivkontrolle Werte im auf dem Fläschchen angegebenen Bereich ergeben.

RESULTATE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch zwei Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. des Prüfmusters

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

Abs. von Kalibrator D

Es wird empfohlen, dass qualitative Resultate als "positiv" oder "negativ" berichtet werden. Probenresultate größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv angesehen.

2. SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG

Die Absorption von Kalibrator A bis E gegen ihre jeweiligen Konzentrationen auf dem linear-logarithmischen Millimeterpapier aufnehmen. Die Konzentrationen in IU/ml auf der X-Achse gegenüber der Absorption auf der Y-Achse aufnehmen und eine Punkt-Zu-Punkt-Kurvenanpassung zeichnen. Die Konzentrationen der Patientenproben von der Kurve gemäß den entsprechenden Absorptionswerten bestimmen. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als "positiv", "negativ", oder "unbestimmt" mit IU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenzlinien Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden, wie in **Begrenzungen des Verfahrens** angegeben, bewertet werden.

Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen von 181 normalen Blutspendern und Nicht-SLE-Krankheitsbekämpfungsproben bestimmt. Der Mittelwert des normalen Probanden plus 3 SD wurden als der Prüfungs-Cutoff ermittelt und einem Wert von 50 IU/ml zugeordnet. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des nachstehenden Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Prüfungswerte für seine eigenen Bedingungen validieren.

dsDNA Ab Wert	Ausdeutung
<50 IU/ml	Negativ
50-60 IU/ml	Unbestimmt (Grenzlinie)
>60 IU/ml	Positiv

Kalibrator

Die Einsatzbereiten Kalibratoren sind enthalten, um Semiquantifizierung zu ermöglichen, und müssen mit jedem Durchgang verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Absorptionswerte ergeben als die von Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um IU/ml-Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die durch den Verdünnungsfaktor erhaltenen Einheiten.

DE

BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

CLIA-Komplexität: Hoch. CDC-Analyt-Identifikationscode: 0425. CDC-Testsystem-Identifikationscode: 28276.

Die Prüfung sollte nicht bei äußerst hämolysierten, mikrobisch verunreinigten oder lipämischen Proben ausgeführt werden. Diese Methode sollte nur zur Prüfung von Humanserum-Proben verwendet werden. Wenn die Prüfergebnisse unbestimmt sind, wird das Prüfen für folgendes empfohlen:

- Antinukleäre Antikörper auf HEp-2 Zellen
- Antinukleäre Antikörper bei Maus-Niere- oder Maus-Leber-Gewebeabschnitten
- Anti-ENA: RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La) Antikörper ELISAs
- nDNA durch indirekte Immunfluoreszenz

Obige Tests sind von IMMCO Diagnostics erhältlich. Siehe Produktkatalog.

Das Prüfen auf ergänzende Spiegel C3 und C4, CH50 und Immunkomplexe wird auch empfohlen. Starke positive Resultate deuten auf SLE hin. Jedoch können negative Ergebnisse eine Diagnose von SLE nicht notwendigerweise ausschließen. Wenn es einen hohen Verdacht auf SLE gibt, dann sollten andere Tests, wie z. B. für ANA, ENA, nDNA und Komplementstufen auch in Betracht gezogen werden. Die erhaltenen Resultate dienen nur als eine Hilfe bei der Diagnose. Für sich alleine genommen, sollten diese Resultate nicht als diagnostisch interpretiert werden.

ERWARTETE WERTE UND ZUSAMMENFASSUNG DER KLINISCHEN STUDIEN

Die Inzidenz von dsDNA-Antikörpern ändert sich abhängig von der Patientenpopulation. Eine Zusammenstellung der Inzidenz, die der Literatur entnommen wurde, ist nachstehend aufgeführt.^{3,7,11-13}

Erkrankung	% Inzidenz
Systemischer Lupus erythematodes	50-55
Aktive Nierenerkrankung	89
Aktive Nichtnierenerkrankung	56
Inaktive Erkrankung	30
Mögliche SLE	32
Rheumatoidarthritis	<12
Sklerodermie	<12
Normale Patienten	<12

Reihen von klinischen Proben wurden auf ImmuLisa™ dsDNA-Antikörper-ELISA. Resultate, die Inzidenz in den Populationen demonstrieren, sind nachstehend aufgeführt:

DE

Diagnose	Anz. getestet	Anz. Positiv	% Positiv*
SLE	249	155	62,2
Primäres Antiphospholipid-Syndrom	25	0	0
Primäre Myositis	20	0	0
Sklerodermie	4	1	25,0
Rheumatoidarthritis	43	5	11,6
Basedowkrankheit	9	0	0
Hashimoto-Thyreoiditis	14	1	7,1
Undifferenzierte Schilddrüsenerkrankung	9	1	11,1
Autoimmuner Gehörverlust	8	0	0
Normal	159	6	3,8

* Unbestimmte/Grenzproben als positiv betrachtet

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit des ImmuLisa™ dsDNA-Antikörper-ELISA wurde beim Prüfen gut charakterisierter Proben von SLE-Probanden mit positiven nDNA IFA-Resultaten neben Erkrankungskontrollen und "normalen" Humanseren bewertet. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen ELISA-Kits geprüft. Nur Proben im linearen Bereich der Prüfung wurden im Methodenvergleich eingeschlossen. Diese Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

ImmuLisa™ dsDNA-Antikörper-ELISA gegenüber anderen dsDNA-Antikörper-ELISA:

Andere dsDNA-Antikörper-ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	71	10	81
dsDNA	Negativ	6	86	92
ELISA	Gesamt	77	96	173

Positive Prozent-Übereinstimmung: 92,2% (95% CI 83,2 % - 96,8 %)

Negative Prozent-Übereinstimmung: 89,6% (95% CI 81,3 % - 94,6 %)

Gesamte Prozent-Übereinstimmung: 90,8% (95% CI 85,2 % - 94,5 %)

SLE-Probanden: 87

Krankheitskontrollen: 28

Gesunde Normale Probanden: 58

Präzision

Die Präzision wurde mit 6 positiven Proben im gesamten Bereich der Prüfung ausgewählt. Prüfungsabläufe von drei Replikaten jeder Probe wurden in 12 Prüfungen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 12 Replikaten jeder Probe bestimmt.

Probe	Mittelwert IU/ml	Gesamtungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
		SD IU/ml	CV %	SD IU/ml	CV %	SD IU/ml	CV %
1	33,6	3,87	11,5%	4,04	11,7%	2,71	7,9%
2	41,0	4,43	10,8%	4,03	10,1%	4,08	10,2%
3	59,8	3,81	6,4%	3,83	6,6%	3,68	6,3%
4	124,9	10,31	8,3%	10,76	8,5%	5,56	4,4%
5	270,7	16,12	6,0%	16,44	5,9%	14,39	5,2%
6	361,6	24,99	6,9%	26,38	7,3%	14,72	4,1%

Reproduzierbarkeit

Prüfungen von Proben im niedrigen negativen Bereich, mittelmäßigen positiven Bereich und ungefähr +/-20 % der Cutoffs der Prüfung wurden ausgeführt, um die qualitative Reproduzierbarkeit zu bestimmen.

86 Replikate jeder Probe wurden getestet.

Resultate der Prüfung für die niedrigen negativen und mittelmäßigen positiven Proben erzeugten eine qualitative Übereinstimmung von 100 %.

Resultate der Prüfung für die Cutoff -20 % Probe erzeugten eine qualitative (negative) Übereinstimmung von 96,4 %.

Resultate der Prüfung für die Cutoff +20 % Probe erzeugten eine qualitative (positive) Übereinstimmung von 98,8 %.

Linearität und Rückgewinnung

Studien wurden unter Verwendung von abstandsgleichen Verdünnungsserien von positiven Proben mit Werten überall im Bereich des Kalibrators ausgeführt, um den linearen Bereich der Prüfung zu bestimmen. Der lineare Bereich der Prüfung wurde bestimmt mit 13,6 - 450 IU/ml. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst. Es wird empfohlen, dass Proben, die Resultate größer als der obere Kalibrator hervorbringen, für genaue semiquantitative Resultate verdünnt und erneut getestet werden.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13,7 - 115,0	0,980 (0,940 - 1,019)	0,171 (-2,699 - 3,042)	1,00	96,3 - 107,1
2	14,9 - 242,3	1,031 (0,983 - 1,079)	0,835 (-6,000 - 7,667)	1,00	91,2 - 106,3
3	43,4 - 398,3	0,911 (0,874 - 0,949)	4,088 (-5,331 - 13,507)	0,998	100,0 - 112,3
4	41,7 - 332,2	0,980 (0,915 - 1,045)	9,735 (-3,518 - 22,988)	0,993	87,6 - 110,6
5	48,9 - 399,5	0,911 (0,868 - 0,954)	6,865 (-4,132 - 17,862)	0,997	97,6 - 110,8

DE

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) für den dsDNA-Antikörper unter Verwendung dieser Prüfung wurde bestimmt zu 13,6 IU/ml basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten von je 6 niedrigstufigen (NHS) Proben.

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten dsDNA-Antikörperspiegeln mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Es wurde für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln keine bedeutende Interferenz demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 μ mol/L) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

FR



ImmuLisa™ Enhanced dsDNA Antibody ELISA

ADN Bicaténaire Anticorps ELISA

IVD

ENCART PRODUIT

REF 5120 dsADN Anticorps ELISA 96 Déterminations

UTILISATION VISEE

L'analyse ELISA à liaison par enzyme immunoabsorbant pour la détection et la semi-quantification des anticorps IgG pour l'ADN bicaténaire (dsDNA) dans le sérum humain, en tant qu'outil d'aide au diagnostic du lupus érythémateux disséminé (LED) en conjonction avec d'autres résultats de laboratoires et cliniques.

RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps antinucléaires (ANA) se trouvent dans différentes maladies auto-immunes. Les ANA contiennent des anticorps pour les antigènes du noyau tel que l'ADN, l'histone ou différents antigènes nucléaires solubles tels que le RNP, le Sm, le SS-A et le SS-B.

Trois spécificités apparaissent avec les anticorps anti-ADN

Dont les suivantes :

1. les anticorps anti-dsADN qui ne réagissent qu'avec les dsADN
2. Les anticorps anti-ssADN qui réagissent avec les ssADN
3. Les anticorps anti-ds/ssADN qui réagissent avec les dsADN et les ssADN

De ces trois sortes, les anticorps anti-dsADN sont caractéristiques du diagnostic du lupus érythémateux disséminé (LED). Ils apparaissent rarement lors d'autres désordres auto-immuns¹⁻⁶. La fréquence et le niveau de ces anticorps fluctue avec l'activité de la maladie en se trouvant dans environ 50-55% des cas de LED et chez environ 89% des patients atteints de LED avec une maladie rénale active³⁻⁷. Les anticorps vers les dsADN peuvent disparaître avec un traitement immunosuppresseur et durant la rémission. Il existe une forte corrélation entre l'activité de la maladie et les niveaux des anticorps anti-dsADN⁸. L'analyse ImmuLisa™ Anticorps dsADN ELISA détecte les anticorps dsADN de la classe IgG Les anticorps anti-ADN d'isotype IgM et IgA se trouvent également mais la pertinence des anticorps de la classe IgG a été prouvée cliniquement³. Les résultats sont rendus en International Units (IU)/ml. Les calibreurs et le contrôle positif ont tous les deux été calibrés par rapport au Reference Reagent Wo/80 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)⁹.

PRINCIPES DE LA PROCEDURE

Le test est réalisé en tant que immunoessai en phase solide. Les micro-récepteurs sont couverts avec des antigènes purifiés dsADN suivi d'une mesure de blocage pour réduire les unions non-spécifique durant l'exécution de

FR

l'analyse. Les contrôles, les calibreurs et le sérum patient sont incubés dans les récipients couverts d'antigènes pour permettre à des anticorps spécifiques présents dans le sérum de se relier à l'antigène dsADN. Les anticorps non-reliés et les autres protéines de sérum sont enlevés en lavant les micro-récipients. Les anticorps reliés sont détectés en ajoutant un conjugué d'enzyme étiqueté associé anti-humain IgG aux micro-récipients. Le conjugué non-relié est enlevé par lavage. Un substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux récipients et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur produit par la conversion du substrat TMB en un produit à réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont donnés en International Units par millilitre (UI/ml) et signalés comme positifs ou négatifs.

LES REACTIFS

Stockage et préparation

Stockez tous les réactifs entre 2 et 8°C. **A ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

A 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 utilisation.

Réhydratez le tampon à eau jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque stocké entre 2 et 8°C, le tampon à eau réhydraté est stable jusqu'à la date d'expiration du kit.

Les lamelles enduites des micro-récipients sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-récipients non utilisées doivent être réapposés avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

Précautions

Tous les composants de dérivation humaine utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 et HTLV-I et ont donné des résultats négatifs en accord avec les tests imposés par la FDA. Cependant, les dérivés de sang humain et les spécimens patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivez de bonnes pratiques de laboratoire pour le stockage, la délivrance et l'écoulement de ces matériaux.

La Solution d'Arrêt est une solution d'acide sulfurique diluée. L'acide sulfurique (H₂SO₄) est toxique et corrosive. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux. Évitez tout contact avec les bases, les métaux et autres composants qui pourraient réagir avec les acides.

Le Substrat d'Enzyme TMB contient une substance irritante qui peut être dangereuse si elle est inhalée, ingérée ou absorbée par voie cutanée. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux.

FR

Les instructions doivent être suivies à la lettre telles qu'elles apparaissent dans cet encart d'utilisation afin d'assurer des résultats valides.

N'échangez pas les composants de l'encart avec ceux d'autres sources. Suivez de bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. N'utilisez pas les composants de l'encart après la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Les matériaux fournis

ImmuLISA™ dsADN Anticorps ELISA

REF 5120

Les encarts contiennent assez de réactifs pour réaliser 96 déterminations.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Microplaque avec des micro-réceptifs individuels séparés Couverts avec un antigène dsADN Prêt à l'emploi.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ dsDNA	Contrôle positif (capsule rouge) prêt à l'emploi Contient du sérum humain positif aux anticorps dsADN. L'éventail de concentration espéré en IU/ML est imprimé sur l'étiquette
1 x 1.75 ml	CONTROL-	Contrôle négatif (capsule blanche) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A dsDNA CALIBRATOR B dsDNA CALIBRATOR C dsDNA CALIBRATOR D dsDNA CALIBRATOR E dsDNA	Série de 5 calibreurs prêts à l'emploi. Calibreur A (capsule verte) 400 IU/ml, Calibreur B (capsule violette) 200 IU/ml, Calibreur C (capsule bleu) 100 IU/ml, Calibreur D (capsule jaune) 50 IU/ml, et Calibreur E (capsule orange) 1 IU/ml. Dérivées de sérum humain contenant des anticorps dsADN. Les concentrations en IU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugué IgG de HRP goat anti-humain. Prêt à l'emploi Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL	Diluant sérum. Prêt à l'emploi Code couleur violet.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi A protéger de la lumière.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solution stop. Prête à l'emploi
2 x vials	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Réhydratez jusqu'à un litre chacun.
1 x		Feuilles de protocole

Composants optionnels

1 x 60ml	BUF WASH	Tampon de lavage en liquide concentré. Réhydratez jusqu'à un litre.
----------	-----------------	---

FR

Symboles utilisés sur les labels.



Numéro de Lot



Numéro catalogue



Utilisation à diagnostic in vitro



A utiliser par :



Température de stockage



Lire les instructions avant utilisation



Nombre de tests



Fabricant

Matériaux nécessaires mais non fournis

- Eau déminéralisée ou distillée
- Bouteille comprimée pour tenir le tampon de lavage
- Pipettes capables de distribuer de 5 µl à 1000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Des tubes test 12 x 75 mm propres et un casier pour tubes test
- Un compte-minutes
- Des serviettes en papier absorbantes
- Un lecteur de microplaques capable de lire des valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm
- Un laveur de microplaques automatique capable de distribuer 200 µl par puits

COLLECTE ET MANIPLICATION DES SPECIMENS

Seuls les spécimens de sérum doivent être utilisés lors de cette procédure. Des spécimens largement contaminés d'hématolyses, de lipémiques et de microbes peuvent interférer avec la réalisation du test et ne doivent pas être utilisés. Stockez les spécimens entre 2° et 8°C pour une période n'excédant pas une semaine. Pour un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Evitez la congélation répétée et le dégel des échantillons. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an.

PROCEDURE

Notes concernant la procédure

- Lire avec attention l'insert du produit avant de commencer l'analyse.
- Toutes les dilutions avec les échantillons patient doivent être préparées avant le début de l'analyse.

FR

- Laissez les spécimens patient et les réactifs test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer avec la procédure test. Il est suggéré de laisser les réactifs sur la banquette en dehors de la boîte pendant 30 minutes avant utilisation. Remplacez tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur immédiatement après utilisation.
- Enlevez les lamelles obligatoires des micro-récipients du sachet et recollez avec précaution le sachet pour éviter la condensation des puits non utilisés. Reposez le sachet dans le réfrigérateur immédiatement.
- **Une bonne technique de lavage est cruciale.** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage adéquat est réalisé en dirigeant un flot fort de tampon de lavage accompagné d'une bouteille de lavage avec un embout large sur l'intégralité de la microplaque. **Une laveuse automatique de microplaques est recommandée**
- Utilisez une pipette multicanaux capable de distribuer 8 à 12 récipients en même temps. Cela accélère le processus et génère des temps d'incubation plus uniformes.
- Pour toutes les étapes, un contrôle minutieux du minutage est important. Le début de toute période d'incubation commence avec la réalisation de l'addition de réactif.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit être réalisé au même rythme et dans le même ordre.

Méthode de test

Etape 1 Laissez tous les réactifs et tous les spécimens s'adapter à la température ambiante.

Etape 2 Etiquetez les feuilles de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les récipients. Une bonne pratique de laboratoire est d'exécuter les échantillons en double.

Etape 3 Pour une détermination qualitative utilisez uniquement le Calibreur D (fiolle avec la capsule jaune).

ou

Pour une détermination semi-quantitative utilisez les Calibreurs A jusqu'à E tels que représentés dans la présentation échantillon ci-dessous.

Qualitative			
A	Vierge	S5	Etc.
B	-	S6	
C	Contrôle	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Semi-qualitative			
A	Vierge	S1	Etc.
B	-	S2	
C	Contrôle	S3	
D	Cal D	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

FR

- Etape 4** Préparez une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **500µl** de diluent sérum.
- Etape 5** Enlevez les micro-réipients requis du sachet et replacez les lamelles non utilisées dans le sachet refermé dans le réfrigérateur. Placez fermement les micro-réipients dans le support supplémentaire fournis.
- Etape 6** Pipetez **100 µl** de calibreurs prêts à l'emploi, de contrôles positifs et négatifs et d'échantillons patient dilués (**1:101**) aux micro-réipients appropriés selon la feuille de protocole.
- A noter** : inclure un récipient contenant **100 µl** de sérum diluant en tant que réactif vierge. Mettez sur zéro le lecteur ELISA contre le réactif vierge.
- Etape 7** Incuber 30 minutes (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec le tampon à lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micro-réipient avec du tampon à lavage reconstitué. Débarrassez-vous du fluide en inversant et en tapotant le contenu de chaque récipient ou bien en aspirant le liquide de chaque récipient. Afin de buvarder à la fin du dernier lavage, inversez les lamelles et tapotez vigoureusement les récipients sur des serviettes de papier absorbantes. Pour les laveuses automatiques, programmez la laveuse selon les instructions du fabricant.
- Etape 9** Pipetez **100 µl** de conjugué dans les micro-réipients.
- Etape 10** Incuber **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Lavez tous les micro-réipients comme lors de l'étape 8.
- Etape 12** Pipetez **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micro-réipient dans le même ordre et selon le même minutage que pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber 30 minutes (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipetez **100 µl** de solution stop dans chaque micro-réipient en utilisant le même ordre et le même minutage que pour l'addition de substrat d'enzyme. Lisez les valeurs d'absorbance dans un délai de **30 minutes** à partir du moment où la solution stop a été ajoutée.
- Etape 15** Lisez l'absorbance de chaque micro-réipient pour **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaque simple ou à double longueur d'onde pour 450/630nm contre le réactif vierge placé sur zéro absorbance.

Contrôle qualité

Les calibreurs, les contrôles positif et négatif et un réactif vierge doivent être utilisés pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. La lecture d'absorbance du réactif vierge doit être $<0,3$. Le calibreur A doit avoir un lecteur d'absorbance supérieur à 1,0 sinon le test devra être répété. Le contrôle négatif doit être <30 IU/ml. Si le test est lancé en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer IU/ml. Lors de la réalisation de déterminations qualitatives, la densité optique du calibreur D doit être supérieure à celle du contrôle négatif et inférieure à l'absorbance du contrôle positif. Pour les déterminations semi-qualitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs comprises dans l'éventail mentionné sur la fiole.

RESULTATS**Calculs**

La concentration des échantillons patients peut être déterminée par l'une des deux méthodes suivantes :

1. DETERMINATON QUALITATIVE

Abs. Echantillon test

----- X IU/ml du calibreur D = IU/ml Echantillon test

Abs. du calibreur D

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au calibreur D sont considérés comme positifs.

2. DETERMINATON SEMI-QUANTITATIVE

Relevez l'absorbance du calibreur A jusqu'au calibreur E par rapport à leurs concentrations respectives sur un papier graphique à logarithme linéaire. Relevez les concentrations en IU/ml sur la base X par rapport à l'absorbance sur la base Y et tracez une courbe point par point. Déterminez les concentrations sur les échantillons patients en se basant sur la courbe en accord avec les valeurs d'absorbance correspondantes. Alternativement, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

Il est recommandé que les résultats semi-quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs unitaires IU/ml. Les résultats indéterminés ou limite doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire, tel qu'indiqué dans les **Limites de la procédure.**

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 181 donneurs de sang normaux et spécimens de contrôle non atteints de LED. La moyenne des sujets normaux plus 3 SD a été établie en tant que limite supérieure de l'analyse et une valeur de 50 IU/ml lui a été attribuée. L'IMMCO suggère l'utilisation de l'éventail de référence ci-dessous. Chaque laboratoire doit valider les valeurs d'analyse pour leurs propres conditions.

Valeur dsADN Ab	Interprétation
<50 IU/ml	Négatif
50-60 IU/ml	Indéterminé (Limite)
>60 IU/ml	Postif

Calibreur

Les calibreurs prêt-à-l'emploi sont fournis pour permettre la semi-quantification et doivent être utilisés avec chaque exécution. Les échantillons patient contenant des niveaux d'anticorps élevés peuvent donner des valeurs d'absorbances supérieures à celles du calibreur A. Afin de déterminer des valeurs semi-quantitatives exactes, de tels spécimens doivent être dilués encore plus afin de rentrer dans l'éventail des la courbe du calibreur lorsqu'ils seront testés de nouveau. Pour déterminer les valeurs IU/ml, multipliez les unités obtenues par le facteur de dilution.

FR

LIMITES DE LA PROCEDURE

Complexité CLIA Forte Code d'identification analyte CDC 0425. Code d'identification du système test CDC 28276.

L'analyse ne doit pas être réalisée sur des échantillons extrêmement hémolisés, contaminés de microbes ou lipémiques. Cette méthode ne doit être utilisée que pour le test de sérum humain. Lorsque les résultats des tests sont indéterminés, une analyse plus poussée pour les facteurs suivants est suggérée :

- Anticorps antinucléaires sur des cellules Hep-2
- Anticorps antinucléaires sur un rein de souris ou sur des sections du tissu du foie de souris
- Anti-ENA: RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La) Anticorps ELISAs
- nADN par immunofluorescence indirecte

Les tests ci-dessus sont disponibles chez IMMACO Diagnostics. Se référer au catalogue de produits.

L'analyse pour des niveaux complémentaires C3 et C4, CH50 et les complexes immunitaires est aussi suggérée. Des résultats positifs forts sont indicatifs de LED. Néanmoins, des résultats négatifs ne peuvent pas nécessairement écarter un diagnostic de LED. Lorsqu'il y a une forte suspicion de LED, alors d'autres tests tels que ceux pour l'ANA, l'ENA, la nADN et des niveaux complémentaires doivent aussi être envisagés. Les résultats obtenus ne servent que d'aide au diagnostic. Pris de manière indépendante, les résultats ne doivent pas être interprétés comme un diagnostic.

VALEURS ATTENDUES ET RESUME DES ETUDES CLINIQUES

Le taux des anticorps dsADN varie en fonction du nombre de patients. Une compilation des taux tirés de la littérature sur le sujet est visible ci-dessous^{3,7,11-13}.

Maladie	Taux en %
Lupus érythémateux disséminé	50-55
Maladie rénale active	89
Maladie active non-rénale	56
Maladie non-active	30
Possible LED	32
Rhumatoïde Arthritis	<12
Sclérodermie systémique	<12
Patients normaux	<1

Des séries d'échantillons cliniques ont été testés avec l'ImmuLisa™ dsADN Anticorps ELISA. Les résultats démontrant l'incidence dans les populations testés sont disponibles ci-dessous :

FR

Diagnostic	No. Testé	No. Positif	% Positif*
LED	249	155	62,2
Syndrome des anti-phospholipides primaire	25	0	0
Myosite	20	0	0
Sclérodermie	4	1	25,0
Arthrite rhumatoïde	43	5	11,6
Maladie de Grave	9	0	0
Thyroïdite de Hashimoto	14	1	7,1
Maladie de la thyroïde indifférenciée	9	1	11,1
Perte d'audition auto-immune	8	0	0
Normal	159	6	3,8

* Les spécimens indéterminés / limite sont considérés comme positifs

CHARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité de la solution ImmuLisa™ dsADN Anticorps ELISA a été évaluée en testant des spécimens bien-caractérisés provenant de sujets atteints de LED avec des résultats nADN IFA positifs à côté de contrôles de maladie et de sérum humain « normal ». Ces spécimens ont également été testés avec des kits ELISA disponibles dans le commerce. Seuls les spécimens dans l'éventail linéaire de l'analyse ont été utilisés dans la méthode de comparaison. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

ImmuLisa™ dsADN Anticorps ELISA contre d'autres dsADN anticorps ELISA:

		Autres dsADN Anticorps ELISA		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	71	10	81
dsADN	Négatif	6	86	92
ELISA	Total	77	96	173

Concordance en pourcentage cas positifs: 92,2% (95% CI 83,2% - 96,8%)

Concordance en pourcentage cas négatifs : 89,6% (95% CI 81,3% - 94,6%)

Concordance en pourcentage tous les cas : 90,8% (95% CI 85,2% - 94,5%)

Sujets LED 87

Contrôles maladie : 28

Sujets normaux en bonne santé : 58

Précision

La précision a été testée avec 6 spécimens positifs sélectionnés à travers l'échantillon utilisé pour l'analyse. Des exécutions d'analyses ont été conduites sur trois mesures de chaque spécimen durant trois jours. La fidélité des résultats a été déterminée avec 12 mesures de chaque spécimen.

Echantillon	Moyenne (IU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		En cours d'exécution Fidélité	
		SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
		(IU/ml)		(IU/ml)		(IU/ml)	
1	33,6	3,87	11,5%	4,04	11,7%	2,71	7,9%
2	41,0	4,43	10,8%	4,03	10,1%	4,08	10,2%
3	59,8	3,81	6,4%	3,83	6,6%	3,68	6,3%
4	124,9	10,31	8,3%	10,76	8,5%	5,56	4,4%
5	270,7	16,12	6,0%	16,44	5,9%	14,39	5,2%
6	361,6	24,99	6,9%	26,38	7,3%	14,72	4,1%

Reproductibilité

Des analyses des échantillons dans l'éventail des cas négatifs bas, des cas modérément positifs et environ +/- 20% des cas à la limite ont été réalisées afin de déterminer la reproductibilité qualitative. 86 répliques de chaque échantillon ont été testées. Les résultats des analyses des spécimens négatifs bas et modérément positifs ont donné une concordance qualitative de 100%. Les résultats des analyses pour les 20% de spécimens en dessous de la limite ont donné une concordance qualitative de 96,4% (négative). Les résultats des analyses pour les 20% de spécimens au dessus de la limite ont donné une concordance qualitative de 98,8% (positive).

Linéarité et rétablissement

Des études ont été menées en utilisant des séries de dilution équidistantes d'échantillons positifs avec des valeurs comprises tout au long de l'éventail des calibreurs afin de déterminer l'étendue linéaire de l'analyse. L'étendue linéaire de l'analyse a été déterminée entre 13,6 – 450 IU/ml.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13,7 - 115,0	0,980 (0,940 - 1,019)	0,171 (-2,699 - 3,042)	1,00	96,3 - 107,1
2	14,9 - 242,3	1,031 (0,983 - 1,079)	0,835 (-6,000 - 7,667)	1,00	91,2 - 106,3
3	43,4 - 398,3	0,911 (0,874 - 0,949)	4,088 (-5,331 - 13,507)	0,998	100,0 - 112,3
4	41,7 - 332,2	0,980 (0,915 - 1,045)	9,735 (-3,518 - 22,988)	0,993	87,6 - 110,6
5	48,9 - 399,5	0,911 (0,868 - 0,954)	6,865 (-4,132 - 17,862)	0,997	97,6 - 110,8

Limite de détection

La limite de détection (LoD) pour l'anticorps dsADN en utilisant cette analyse a été évaluée à 13,6 IU/ml basé sur 60 mesures des échantillons vierges et 10 mesures pour chacun des 6 échantillons à niveau bas (NHS).

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant le sérum avec des niveaux d'anticorps dsADN connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 µmol/L), et facteur rhumatoïde (100 EU/ml).



ImmuLISA™ Enhanced dsDNA Antibody ELISA

ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-DNA a doppio filamento



FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 5120 dsDNA Antibody ELISA 96 determinazioni

USO PREVISTO

Dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento e la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgG anti-DNA a doppio filamento (dsDNA) nel siero umano, come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico (LES), in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La presenza degli anticorpi antinucleari (ANA) è comune a vari disturbi autoimmuni. Gli ANA includono anticorpi diretti contro gli antigeni del nucleo, come ad esempio DNA e istone, oltre a vari antigeni nucleari estraibili come per esempio RNP, Sm, SS-A e SS-B. Gli anticorpi anti-DNA mostrano tre specificità.

Queste comprendono:

1. Anticorpi anti-dsDNA che reagiscono solo con il dsDNA.
2. Anticorpi anti-ssDNA che reagiscono solo con l'ssDNA.
3. Anticorpi anti-ds/ssDNA che reagiscono sia con il dsDNA, sia con l'ssDNA.

Fra questi tipi, gli anticorpi anti-dsDNA sono caratteristici del lupus eritematoso sistemico (LES). Essi sono raramente presenti in altri disturbi autoimmuni.¹⁻⁶ La frequenza e i livelli di questi anticorpi fluttuano secondo l'attività della malattia e mostrano valori globali del 50-55% sui casi di LES e di circa l'89% tra i pazienti con LES e nefropatia attiva.³⁻⁷ Gli anticorpi anti-dsDNA possono scomparire con il trattamento immunosoppressivo e durante la remissione. Esiste una buona correlazione fra l'attività della malattia e i livelli di anticorpi anti-dsDNA.⁸ Il dosaggio ImmuLISA™ dsDNA Antibody ELISA rileva gli anticorpi anti-dsDNA della classe IgG. Possono essere presenti anche anticorpi anti-DNA degli isotipi IgM e IgA, ma gli anticorpi della classe IgG hanno mostrato di essere clinicamente pertinenti.³ I risultati sono riportati in unità internazionali (UI)/ml. Sia i calibratori, sia il controllo positivo, sono stati calibrati contro il reagente di riferimento Wo/80 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).⁹

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio immunoenzimatico in fase solida. I micropozzetti sono rivestiti con antigene dsDNA purificato, cui segue un passaggio di arresto per ridurre il legame non specifico durante l'esecuzione del dosaggio. Controlli, calibratori e sieri del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di

IT

legarsi all'antigene dsDNA. Gli anticorpi non legati e le altre proteine sieriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai micropozzetti un coniugato anti-IgG umana marcato enzimaticamente. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza degli anticorpi viene rilevata tramite una variazione di colore prodotta dalla conversione del substrato TMB in un prodotto di reazione colorato. La reazione viene arrestata e l'intensità della variazione di colore, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità internazionali per millilitro (UI/ml) e refertati come positivi o negativi.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

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

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

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere risigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.¹⁰

La soluzione di arresto è costituita da acido solforico diluito. L'acido solforico (H₂SO₄) è velenoso e corrosivo. Non ingerire ed evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Evitare l'esposizione a basi, metalli o altri composti che possono reagire con gli acidi.

Il substrato enzimatico TMB contiene un irritante che può essere nocivo se inalato, ingerito o assorbito attraverso la pelle. Non ingerire ed evitare il contatto con la pelle e con gli occhi.

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

IT

Materiali forniti

ImmuliSTM dsDNA Antibody ELISA

REF 5120

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Micropiastre con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene dsDNA. Pronta per l'uso.
1 x 1.75 ml	CONTROL +dsDNA	Controllo positivo (<i>tappo rosso</i>), pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi anti-dsDNA. L'intervallo di concentrazione previsto in UI/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Controllo negativo (<i>tappo bianco</i>), pronto per l'uso. Contiene siero umano.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A dsDNA CALIBRATOR B dsDNA CALIBRATOR C dsDNA CALIBRATOR D dsDNA CALIBRATOR E dsDNA	Serie di 5 calibratori pronti per l'uso. Calibratore A (tappo verde) 400 UI/ml, calibratore B (tappo viola) 200 UI/ml, calibratore C (tappo blu) 100 UI/ml, calibratore D (tappo giallo) 50 UI/ml, e calibratore E (tappo arancione) 1 UI/ml. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-dsDNA. Le concentrazioni in UI/ml sono stampate sulle etichette.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Coniugato HRP di montone anti-IgG umane. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente per siero. Pronto per l'uso. Colore codificato porpora.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Soluzione di arresto. Pronta per l'uso.
2 x vials	BUF WASH	Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.
1 x		Schede del protocollo

Componenti facoltativi

1 x 60 ml	BUF WASH	Tampone di lavaggio concentrato liquido. Ricostituire a un litro.
-----------	-----------------	---

Simboli utilizzati sulle etichette



Codice del lotto



Numero di catalogo



Per uso diagnostico *in vitro*



Utilizzare entro



Temperatura di conservazione



Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso



Numero di test



Fabbricante

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua deionizzata o distillata.
- Boccetta comprimibile per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl.
- Puntali monouso per pipette.
- Provette pulite 12 x 75 mm e rastrelliera per provette.
- Contaminuti.
- Salviette di carta assorbente.
- Lettore per micropiastre capace di leggere valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl per pozzo.

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

PROCEDURA**Note sulla procedura**

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente. Prima dell'uso, si consiglia di lasciare i reagenti sul piano di lavoro e fuori dalla scatola per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere nel frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta nel frigorifero.
- **È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo un energico getto di tampone di lavaggio con una boccetta di lavaggio a bocca larga sull'intera micropiastro. **Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.**
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di riempire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Questo strumento accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.

IT

- L'aggiunta di tutti i campioni e dei reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

Metodo del test

Passaggio 1 Lasciar equilibrare a temperatura ambiente tutti i reagenti e i campioni.

Passaggio 2 Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.

Passaggio 3 Per una **determinazione qualitativa** utilizzare unicamente il calibratore D (*flaconcino con tappo giallo*).

oppure

Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i calibratori da A fino a E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

Qualitativa				Semiquantitativa			
A	Bianco	S5	Ecc.	A	Bianco	S1	Ecc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+ Controllo	S7		C	+ Controllo	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Passaggio 4 Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente miscelando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di diluente per siero.

Passaggio 5 Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere in frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.

Passaggio 6 Pipettare **100 µl** di calibratori pronti all'uso, controllo positivo, controllo negativo e campioni diluiti del paziente (**1:101**) nei micropozzetti appropriati in base alla scheda del protocollo.

Nota: includere un pozzetto contenente **100 µl** del diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.

Passaggio 7 Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

IT

Passaggio 8 Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti capovolgendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su salviette di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.

Passaggio 9 Pipettare **100 µl** di coniugato nei micropozzetti.

Passaggio 10 Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

Passaggio 11 Lavare tutti i micropozzetti come al Passaggio 8.

Passaggio 12 Pipettare **100 µl** di substrato enzimatico in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per il coniugato.

Passaggio 13 Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

Passaggio 14 Pipettare **100 µl** di soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere valori di assorbanza entro **30 minuti** dell'aggiunta della soluzione di arresto.

Passaggio 15 Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a **450 nm** utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola (450/630 nm se si utilizza un lettore a lunghezza d'onda doppia), contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.

Controllo di qualità

Inserire in ogni dosaggio i calibratori, il controllo positivo, quello negativo e un reagente bianco per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza per il reagente bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti il test deve essere ripetuto. Il controllo negativo deve essere <30 UI/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, utilizzare la media di due letture per determinare il valore in UI/ml. Durante l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitative, il controllo positivo deve fornire valori compresi nell'intervallo dichiarato sul flaconcino.

RISULTATI

Calcoli

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

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. campione test

Ass. calibratore D

X UI/ml del calibratore D = UI/ml del campione test

IT

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". Risultati del campione superiori o pari al calibratore D sono considerati positivi.

2. **DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA**

Tracciare su carta illimitata lineare-logaritmica l'assorbanza dal calibratore A fino al calibratore E rispetto alle loro concentrazioni. Tracciare le concentrazioni in UI/ml sull'asse X rispetto all'assorbanza sull'asse Y e disegnare una curva interpolante punto per punto. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbanza corrispondenti. In alternativa, è possibile utilizzare una curva a quattro parametri per tracciare la curva standard.

Si raccomanda di refertare i risultati semiquantitativi come "positivi", "negativi" o "indeterminati" con i valori delle unità in UI/ml. In presenza di risultati indeterminati/borderline, ripetere il test e valutare unitamente ad altri metodi di laboratorio, come indicato nei **Limiti della procedura**.

Interpretazione

I valori di interpretazione sono stati determinati testando 181 donatori di sangue normali e campioni di controllo senza malattia LES. Come cut-off del dosaggio è stata stabilita la media dei soggetti normali più 3 DS ed è stato assegnato un valore di 50 IU/ml. IMMCO suggerisce l'uso dell'intervallo di riferimento riportato di seguito. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del dosaggio in base alle proprie condizioni.

Valore antic. anti-dsDNA Interpretazione

<50 UI/ml	Negativo
50-60 UI/ml	Indeterminato (borderline)
>60 UI/ml	Positivo

Calibratore

Il kit include calibratori pronti all'uso per fornire in ogni sessione una determinazione semiquantitativa. Campioni del paziente contenenti livelli anticorpali elevati possono fornire valori di assorbanza superiori a quello del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, questi campioni devono essere ulteriormente diluiti in modo da rientrare nell'intervallo della curva del calibratore alla ripetizione del test. Per determinare i valori UI/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Complessità CLIA: elevata. Codice di identificazione analita CDC: 0425. Codice di identificazione sistema di test CDC: 28276.

Non eseguire il dosaggio su campioni che presentano emolisi macroscopica, contaminazione microbica o lipemia. Questo metodo deve essere utilizzato solo per testare campioni di siero umano. Quando i risultati di analisi sono indeterminati, si raccomandano ulteriori test:

- Anticorpi antinucleari sulle cellule HEp-2.
- Anticorpi antinucleari su sezioni tissutali di rene o di fegato murino.

IT

- Anti-ENA: ELISA per il rilevamento degli anticorpi contro RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La).
- nDNA mediante immunofluorescenza indiretta.

I test succitati sono disponibili presso IMMCO Diagnostics. Consultare il catalogo prodotti.

Si raccomanda anche l'analisi dei livelli del complemento C3 e C4, di CH50 e dei complessi immuni. Risultati fortemente positivi sono indicativi del LES. Tuttavia, i risultati negativi non possono necessariamente escludere una diagnosi di LES. In presenza di un forte sospetto di LES, vanno quindi considerati anche altri test, come ad esempio i livelli di ANA, ENA, nDNA e del complemento. I risultati ottenuti servono solo come ausilio nella diagnosi. Considerati da soli, questi risultati non devono essere interpretati come diagnostici.

VALORI PREVISTI E RIEPILOGO DEGLI STUDI CLINICI

L'incidenza degli anticorpi anti-dsDNA varia in base alla popolazione di pazienti. La seguente tabella mostra una raccolta di dati sull'incidenza ricavati dalla letteratura.^{3,7,11-13}

Malattia	% incidenza
Lupus eritematoso sistemico	50-55
Nefropatia attiva	89
Malattia non renale attiva	56
Malattia inattiva	30
Possibile LES	32
Artrite reumatoide	<12
Sclerodermia sistemica	<12
Pazienti normali	<1

Le serie di campioni clinici sono state testate con i dosaggi ImmuLisa™ dsDNA Antibody ELISA. La tabella seguente mostra i risultati dell'incidenza nelle popolazioni:

Diagnosi	N, testati	N, positivi	% positivi*
LES	249	155	62,2
Sindrome da anticorpi antifosfolipidi primaria	25	0	0
Miosite primaria	20	0	0
Sclerodermia	4	1	25,0
Artrite reumatoide	43	5	11,6
Malattia di Graves	9	0	0
Tiroidite di Hashimoto	14	1	7,1
Tiroidite indifferenziata	9	1	11,1
Ipoacusia autoimmune	8	0	0
Normale	159	6	3,8

* Campioni indeterminati/borderline considerati positivi

IT

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità del dosaggio ImmuLisa™ dsDNA Antibody ELISA è stata valutata testando campioni ben caratterizzati da soggetti LES con risultati IFA nDNA positivi, accanto a controlli di malattia e sieri umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su kit ELISA commercialmente disponibili. Il confronto dei metodi ha incluso solo i campioni nell'intervallo lineare del dosaggio. Questi risultati sono riepilogati nella seguente tabella.

ImmuLisa™ dsDNA Antibody ELISA vs. altro ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-dsDNA.

Altro ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-dsDNA

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	71	10	81
ELISA dsDNA	Negativo	6	86	92
	Totale	77	96	173

Concordanza percentuale positiva: 92,2% (IC al 95%: da 83,2% a 96,8%)

Concordanza percentuale negativa: 89,6% (IC al 95%: da 81,3% a 94,6%)

Concordanza percentuale totale: 90,8% (IC al 95%: da 85,25% a 94,5%)

Soggetti con LES: 87

Controlli di malattia: 28

Soggetti normali sani: 58

Precisione

La precisione è stata testata con 6 campioni positivi selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. In tre giorni sono state condotte sessioni analitiche di tre replicati di ogni campione. La ripetibilità è stata determinata con 12 replicati di ogni campione.

Campione	Media (IU/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
		DS (IU/ml)	CV %	DS (IU/ml)	CV %	DS (IU/ml)	CV %
1	33,6	3,87	11,5%	4,04	11,7%	2,71	7,9%
2	41,0	4,43	10,8%	4,03	10,1%	4,08	10,2%
3	59,8	3,81	6,4%	3,83	6,6%	3,68	6,3%
4	124,9	10,31	8,3%	10,76	8,5%	5,56	4,4%
5	270,7	16,12	6,0%	16,44	5,9%	14,39	5,2%
6	361,6	24,99	6,9%	26,38	7,3%	14,72	4,1%

Riproducibilità

Per determinare la riproducibilità qualitativa, sono stati effettuati dieci dosaggi dei campioni nell'intervallo negativo basso, nell'intervallo positivo moderato e in circa +/- 20% dei cut-off del dosaggio. I risultati del dosaggio per questi campioni hanno prodotto una concordanza qualitativa del 100%.

IT

Per determinare la riproducibilità qualitativa, sono stati effettuati dosaggi dei campioni nell'intervallo negativo basso, nell'intervallo positivo moderato e in circa +/- 20% dei cut-off del dosaggio. Sono stati testati 86 replicati di ogni campione. I risultati del dosaggio per i campioni nell'intervallo negativo basso e nell'intervallo positivo moderato hanno prodotto una concordanza qualitativa del 100%. I risultati del dosaggio per il campione con cut-off -20% hanno prodotto una concordanza qualitativa del 96,4%. I risultati del dosaggio per il campione con cut-off +20% hanno prodotto una concordanza qualitativa del 98,8%.

Linearità e recupero

Per determinare l'intervallo lineare del dosaggio, sono stati effettuati studi utilizzando serie di diluizioni equidistanti dei campioni positivi con i valori attraverso l'intervallo del calibratore. L'intervallo lineare determinato del dosaggio era pari a 13,6-450 UI/ml. I risultati sono riepilogati di seguito.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13,7 - 115,0	0,980 (0,940 - 1,019)	0,171 (-2,699 - 3,042)	1,00	96,3 - 107,1
2	14,9 - 242,3	1,031 (0,983 - 1,079)	0,835 (-6,000 - 7,667)	1,00	91,2 - 106,3
3	43,4 - 398,3	0,911 (0,874 - 0,949)	4,088 (-5,331 - 13,507)	0,998	100,0 - 112,3
4	41,7 - 332,2	0,980 (0,915 - 1,045)	9,735 (-3,518 - 22,988)	0,993	87,6 - 110,6
5	48,9 - 399,5	0,911 (0,868 - 0,954)	6,865 (-4,132 - 17,862)	0,997	97,6 - 110,8

Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) per gli anticorpi anti-dsDNA utilizzando questo dosaggio è stato determinato pari a 13,6 UI/ml, in base a 60 replicati del bianco e 10 replicati ciascuno dei 6 campioni a basso livello (NHS).

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-dsDNA con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 µmol/l) e fattore reumatoide (100 UE/ml).

PT



ImmuliTM Enhanced dsDNA Antibody ELISA

Anticorpo Anti Cadeia Dupla de DNA ELISA

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5120 dsDNA Antibody ELISA 96 Determinações

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos IgG anti cadeia dupla de DNA (dsDNA) presente no soro humano, com o objectivo de ajudar no diagnóstico do lúpus eritematoso sistémico (LES) em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Em muitas doenças auto-imunes são encontrados anticorpos antinucleares (ANA). Os ANA incluem anticorpos contra antígenos nucleares, como o ADN, a histona e diversos antígenos nucleares extraíveis, como o RNP, Sm, SS-A e SS-B. Ocorrem três singularidades com os anticorpos anti ADN.

Estas incluem:

1. Anticorpos anti-dsDNA que só reagem com o dsDNA
2. Anticorpos anti-ssDNA que reagem com o ssDNA
3. Anticorpos anti-ds/ssDNA que reagem com o dsDNA e com o ssDNA.

Destes três tipos, os anticorpos anti-dsDNA são característicos do lúpus eritematoso sistémico (LES). Estes raramente ocorrem noutros distúrbios auto-imunes.¹⁻⁶ A frequência e os níveis destes anticorpos oscilam com a actividade da doença, ocorrendo geralmente em cerca de 50-55% dos casos de LES e em cerca de 89% dos pacientes com LES com doença renal activa.³⁻⁷ Os anticorpos contra o dsDNA podem desaparecer com um tratamento à base de immunosuppressores e durante a remissão. Existe uma boa correlação entre a actividade da doença e os níveis de anticorpos anti-dsDNA.⁸ O Ensaio ImmuliTM aos Anticorpos anti dsDNA ELISA detecta anticorpos anti dsDNA da classe IgG. Os anticorpos Anti-ADN dos isótipos IgM e IgA também ocorrem, mas os anticorpos da classe IgG revelaram-se clinicamente relevantes.³ Os resultados são relatados em Unidades Internacionais (IU)/ml. Os calibradores e o controlo positivo foram calibrados contra o Reagente de Referência Wo/80⁹ da Organização Mundial de Saúde (OMS).

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoensaio de base sólida. Os micropoços são revestidos com antígeno purificado de dsDNA, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação da proteína não-específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e o soro do paciente são incubados em poços revestidos com antígenos, permitindo que os anticorpos

PT

específicos presentes no soro se liguem ao antígeno do dsDNA. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados pela adição de uma enzima conhecida como IgG anti-humana ou conjugado aos micropoços. O conjugado não ligado é eliminado através de lavagem. Posteriormente, adiciona-se aos poços um substrato de uma enzima específica (TMB), detectando-se a presença de anticorpos, através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em Unidades Internacionais por mililitro (IU/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2, HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.¹⁰

A Stop Solution é uma solução diluída de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) é venenoso e corrosivo. Não ingerir e evite contato com a pele e os olhos. Evite exposição a bases, metais ou demais compostos que possam ter uma reacção com os ácidos.

TMB O Substrato Enzimático contém um irritante que pode ser nocivo se inalado, ingerido ou absorvido através da pele. Não ingerir e evite contato com a pele e os olhos.

PT

As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit com componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

Material fornecido

ImmuliSis™ dsDNA Anticorpo ELISA

REF 5120

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.









12 x 8	MICROPLATE dsDNA	Microplaca com micropoços individuais separados. Revestidos com antígeno dsDNA. Prontos a utilizar,
1 x 1.75 ml	CONTROL + dsDNA	Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos dsDNA . A faixa de concentração esperada em IU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Controlo Negativo pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A dsDNA CALIBRATOR B dsDNA CALIBRATOR C dsDNA CALIBRATOR D dsDNA CALIBRATOR E dsDNA	Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 400 IU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 200 IU/ml, Calibrador C (tampa azul) 100 IU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 50 IU/ml, e Calibrador E (tampa laranja) 1 IU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos dsDNA. As concentrações em IU/ml estão impressas nas etiquetas.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado HRP de cabra anti IgG humano. Prontos a utilizar, Código de cor rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluinte de Soro. Prontos a utilizar, Código de cor roxo.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimático TMB. Prontos a utilizar, Proteger da luz.
1 x 15 ml	STOP H ₂ SO ₄	Solução de Paragem. Prontos a utilizar,
2 x vials	BUF WASH	Tampão de lavagem de pó. Reconstituir para um litro cada.
1 x		Folhas de Protocolo.

Componentes Opcionais

1 x 60ml	BUF WASH	Tampão de Lavagem Líquido concentrado. Reconstituir para um litro.
----------	-----------------	--

PT

Símbolos utilizados nas etiquetas

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Ler as instruções antes de utilizar
	Número de testes
	Fabricante

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl por o poço.

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2ª a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a uma temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Sugere-se que os reagentes sejam deixados em cima da bancada, no exterior da caixa, durante 30 minutos antes da sua utilização. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.

PT

- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação nos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- **Uma boa técnica de lavagem é fundamental** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de ponta larga. **Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.**
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.
- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

Método de Teste

1º Passo Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente

2º Passo Etiquetar folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.

3º Passo Utilizar apenas o Calibrador D (*ampola com tampa amarela*) para obter uma **determinação qualitativa**.

ou

Utilizar os Calibradores A até E para uma **determinação semi-quantitativa**, conforme se descreve no esquema de amostras seguinte.

Qualitativa

A	Branca	S5	Etc.
B	-Control	S6	
C	+ Control	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Semi-quantitativa

A	Branca	S1	Etc.
B	-Control	S2	
C	+ Control	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

4º Passo Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500µl** de Diluente de Soro.

PT

- 5º Passo** Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.
- 6º Passo** Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.
- Nota:** Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.
- 7º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- 8º Passo** Lavar **4x** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.
- 9º Passo** Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- 10º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.
- 11º Passo** Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.
- 12º Passo** Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempo utilizados para o Conjugado.
- 13º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.
- 14º Passo** Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados na adição do Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.
- 15º Passo** Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser <0.3 . O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1.0, caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser <30 IU/ml. Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar IU/ml. Quando se realizam determinações Qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para as determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador D}} \times \text{IU/ml do Calibrador D} = \text{IU/ml Amostra de Teste}$$

Abs. do Calibrador D

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos.” Amostras com resultados superiores ou iguais ao Calibrador D são consideradas positivas.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Traçar a absorvância do Calibrador A até E, consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em IU/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários IU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais, conforme indicado nas **Limitações do Procedimento**.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados, testando 181 dadores de sangue normal e amostras sem controlo da doença LES. A média dos indivíduos normais mais 3 SD foi estabelecida como o corte do ensaio e foi atribuído um valor arbitrário de 50 IU/ml. A IMMCO sugere a utilização da série de referência abaixo. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

Valor dsDNA Ab	Interpretação
<50 IU/ml	Negativo
50-60 IU/ml	Indeterminado (Linha Divisória)
>60 IU/ml	Positivo

Calibrador

São incluídos Calibradores Prontos a Utilizar para fornecer a semi-quantificação, devendo ser utilizados em cada ensaio. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas de modo a recaírem na série da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para determinar valores IU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo factor de diluição.

PT

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Complexidade CLIA: Elevada. CDC Código de Identificação Analítico: 0425. Código de Identificação de Sistema de Teste CDC: 28276.

O ensaio não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipêmicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Quando os resultados dos testes forem indeterminados, sugere-se a realização dos seguintes testes:

- Anticorpos antinucleares em células HEp-2
- Anticorpos antinucleares em secções teciduais de Rim de Rato ou Fígado de Rato
- Anti-ENA: RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La) Anticorpo ELISAs
- nDNA por imunofluorescência indirecta

Os testes acima mencionados estão disponíveis na IMMCO Diagnostics. Consultar o Catálogo de Produtos.

Sugere-se igualmente a realização de testes para os níveis complementares C3 e C4, CH50 e complexos imunes. Resultados fortemente positivos são indicativos de LES. No entanto, os resultados negativos não podem necessariamente excluir um diagnóstico de LES. Quando existir uma elevada suspeita de LES, então devem ser considerados outros testes, como ANA, ENA, nDNA e níveis complementares. Os resultados obtidos servem exclusivamente como ajuda ao diagnóstico. Caso sejam considerados isoladamente, estes resultados não devem ser interpretados como um diagnóstico.

VALORES ESPERADOS E RESUMO DE ESTUDOS CLÍNICOS

A incidência dos anticorpos dsDNA varia de acordo com a população de pacientes. Abaixo segue-se uma compilação de incidências retiradas da literatura.^{3,7,11-13}

Doença	% de Incidência
lúpus eritematoso sistémico	50-55
Doença renal activa	89
Doença não-renal activa	56
Doença inactiva	30
Possível LES	32
Artrite Reumatóide	<12
Esclerodermia Sistémica	<12
Pacientes normais	<1

Foram testados conjuntos de amostras clínicas através do ImmuLisa™ Anticorpos dsDNA ELISA. Os resultados demonstrativos da incidência nas populações são revelados em seguida:

PT

Diagnóstico	No. Testados	No. Positivo	% Positivo*
SLE	249	155	62,2
Síndrome do anti-corpo antifosfolípide primária	25	0	0
Miosite Primária	20	0	0
Scleroderma	4	1	25,0
Artrite Reumatóide	43	5	11,6
Doença de Graves	9	0	0
Tiroidite de Hashimoto	14	1	7,1
Doença não diferenciada da tiróide	9	1	11,1
Perda Auditiva Imunomediada	8	0	0
Normal	159	6	3,8

* Espécimes Indeterminadas/Limítrofes consideradas positivas

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLisa™ Anticorpo dsDNA ELISA foi avaliada através de testes a amostras de soro bem caracterizadas de sujeitos suspeitos de LES, com resultados nDNA IFA positivos, a par de controlos de doenças e de soro humano “normal”. Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste ELISA comercialmente disponíveis. Só foram incluídas no método comparativo as amostras no intervalo linear do ensaio. Estes resultados são seguidamente resumidos.

ImmuLisa™ anticorpo dsDNA ELISA vs. outro kit de anticorpo dsDNA ELISA:

		Outro Anticorpo dsDNA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	71	10	81
dsDNA	Negativo	6	86	92
ELISA	Total	77	96	173

Acordo percentual positivo: 92,2% (95% CI 83,2% - 96,8%)

Acordo percentual negativo: 89,6% (95% CI 81,3% - 94,6%)

Acordo percentual global: 90,8% (95% CI 85,2% - 94,5%)

Indivíduos com LES: 87

Controlos da Doença: 28

Indivíduos saudáveis normais: 58

Precisão

A precisão foi testada com 6 amostras positivas seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram conduzidos ensaios a três réplicas de cada amostra em 12 ensaios. A repetibilidade foi determinada com 12 réplicas de cada amostra.

PT

Amostra	Média (IU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na Experiência (Repetibilidade)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	33,6	3,87	11,5%	4,04	11,7%	2,71	7,9%
2	41,0	4,43	10,8%	4,03	10,1%	4,08	10,2%
3	59,8	3,81	6,4%	3,83	6,6%	3,68	6,3%
4	124,9	10,31	8,3%	10,76	8,5%	5,56	4,4%
5	270,7	16,12	6,0%	16,44	5,9%	14,39	5,2%
6	361,6	24,99	6,9%	26,38	7,3%	14,72	4,1%

Reprodutibilidade

Os ensaios de amostras na faixa negativa baixa, faixa positiva moderada e aproximadamente +/- 20% dos cortes dos ensaios foram realizados para determinar a reprodutibilidade qualitativa. 86 réplicas de cada amostra foram testadas. Os resultados dos ensaios para os espécimes negativos baixos e positivos moderados produziram 100% da concordância qualitativa. Os resultados dos ensaios para o espécime de corte de -20% produziram 96.4% de concordância qualitativa (negativa). Os resultados para o espécime de corte de +20% produziram 98.8% de concordância qualitativa (positiva).

Linearidade e Recuperação

Foram realizados estudos que utilizaram séries de diluições equidistantes de amostras positivas com valores por toda a série do calibrador para determinar a série linear do ensaio. A série linear dos ensaios foi determinada como 13,6 – 450 IU/ml. Os resultados são seguidamente resumidos..

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R ²	% Recovery
1	13,7 - 115,0	0,980 (0,940 - 1,019)	0,171 (-2,699 - 3,042)	1,00	96,3 - 107,1
2	14,9 - 242,3	1,031 (0,983 - 1,079)	0,835 (-6,000 - 7,667)	1,00	91,2 - 106,3
3	43,4 - 398,3	0,911 (0,874 - 0,949)	4,088 (-5,331 - 13,507)	0,998	100,0 - 112,3
4	41,7 - 332,2	0,980 (0,915 - 1,045)	9,735 (-3,518 - 22,988)	0,993	87,6 - 110,6
5	48,9 - 399,5	0,911 (0,868 - 0,954)	6,865 (-4,132 - 17,862)	0,997	97,6 - 110,8

PT

Limite de Detecção

O limite de detecção (LoD) para os anticorpos dsDNA através deste ensaio foi determinado em 13,6 IU/ml, com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 60 réplicas de cada uma das 6 amostras de baixo nível (NHS).

Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis conhecidos de anticorpos dsDNA com amostras de soro potencialmente interferentes, e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), e Factor Reumatóide (100 EU/ml).

REFERENCES

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. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
11. Conrad K, Schössler W, Hiepe F. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases, a diagnostic reference. 2002; 69-72.
12. Vánca A et al. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary dermatomyositis: Relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. *Joint Bone Spine.* 2010; 77:125-30.
13. Ruffatti A et al. Anti-double-stranded DNA antibodies in the healthy elderly: prevalence and characteristics. *J Clin Immunol.* 1990; 10:300-3.

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@immcodiagnostics.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

OCT2011

Document No. PI5120