

Instruction

DIASTAT[®] Anti-dsDNA

For professional use only
Usage reserve aux professionnels
Sólo para uso profesional
Nur für den fachgebrauch
Solo per uso professionale
Endast för professionell användning



Document No. LABEL-DOC-0024 2.0

DIASTAT[®] Anti-dsDNA

English: page 2
Français: page 14
Español: página 27
Deutsch: Seite 40
Italiano: pagina 52
Svenska: sida..... 64

INTENDED USE

The DIASTAT® anti-dsDNA test is a quantitative/qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG and IgM autoantibodies specific for double-stranded DNA (dsDNA) in human serum or plasma. It is intended to aid in the diagnosis of systemic lupus erythematosus, and to monitor dsDNA antibody levels during treatment and remission and is not definitive in isolation. Autoantibody levels represent one parameter in a multicriterion diagnostic process.

INTRODUCTION

Systemic rheumatic diseases are autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis and mixed connective tissue disease. A general feature of systemic rheumatic diseases is the presence of circulating antibodies to a variety of cellular antigens. The detection and serological characterisation of specific autoantibodies plays an important role in the differential diagnosis of these diseases^{1,2}.





Antibodies against dsDNA are highly specific for SLE and are detected at a high frequency in untreated patients with active disease³. The presence of dsDNA antibodies in SLE is one of the criteria for disease classification by the American Rheumatism Association⁴. Several investigators have reported a correlation between disease activity and fluctuations in antibody levels^{5,6}, consequently the monitoring of dsDNA activity is considered of use in the management of SLE patients⁷.

A number of techniques are available for detecting dsDNA autoantibodies, including Farr radioimmunoassay and the *Crithidia luciliae* immunofluorescence assay. These tests have inherent drawbacks in complexity, lack of sensitivity and reproducibility. ELISAs offer simplicity, sensitivity, reproducibility and objectivity over other methods⁸ and can be standardised by reference to the World Health Organisation (WHO) anti-dsDNA standard, Wo/80⁹.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with a preparation of calf thymus selected for its high dsDNA content. During the first incubation, specific autoantibodies in diluted serum or plasma bind to the antigen-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, enzyme-labelled antibodies to human IgG and IgM, binds any surface-bound autoantibodies. After further washing, specific autoantibodies are traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units. In the qualitative protocol, the amount of Conjugate bound by the sample is compared with that bound by the Reference Control. In the quantitative protocol, the concentration of anti-dsDNA autoantibody can be estimated by interpolation from a dose-response curve based on Standards. The Standards are referenced against WHO Reference Preparation Wo/80 and reported in International units per mL (IU/mL).

KIT COMPONENTS

A	IgG/IgM Conjugate	1 × 15mL	Alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG and IgM, Tris buffer, protein stabiliser, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
B	Substrate	1 × 15mL	Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage.	
C	Stop Solution	1 × 15mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). Ready-to-use.	
D	Wash Buffer Concentrate (16X)	2 × 25mL	Borate buffer, 0.4% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
E	dsDNA-Coated Wells and Strip Holder	12 × 8 well microtitre strips	Coated with dsDNA antigen, in a resealable foil pack with desiccant. Colour-coded LIME GREEN . Individual wells can be broken off from each microtitre strip.	
F	Sample Diluent 2 Concentrate (5X)	1 × 25mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 5% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
1-5	Anti-dsDNA Standards	5 × 1.0mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. 0, 10, 50, 150, 300 IU/mL. Ready-to-use.	
6	Anti-dsDNA Reference Control	1 × 1.5mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
+/-	Positive Control Negative Control	1 × 0.2mL 1 × 0.1mL	Human plasma, <0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:101 with diluted Sample Diluent 2 before use, as for samples.	
	Pack Leaflet			

STORAGE OF REAGENTS

Opened Kit Stability

A kit was opened and reused on three occasions over a three months period with no adverse effect on kit performance.

Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2-8° C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. Do not freeze kits.
4. Wash Buffer Concentrate, Sample Diluent 2 Concentrate and Positive and Negative Controls must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
5. Diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent 2 are stable at 2-8° C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
6. Replace surplus microtitre strips in the foil pack and store with the desiccant at 2-8° C, until required.
7. The plate holder is adapted for use with snappable wells only.
8. Do not expose Substrate to light during storage.
9. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.

Indications of Deterioration

The Substrate should be pale yellow in colour. Pink colouring indicates contamination and the reagent must be discarded. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded.

Sample Collection and Storage

The assay is recommended for serum/plasma samples; do not use lipaemic, haemolysed or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Do not heat-inactivate samples, this may yield false positive results.

Samples must be assayed within 12 hours of collection, or may be stored at or below -20° C.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. Standards and Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Standards and Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edition, 1993, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Standards, Controls, Conjugate, Sample Diluent 2 Concentrate and Wash Buffer Concentrate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.
7. The Stop Solution contains sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped up with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.
8. The substrate contains PMP, Bronidox L, and Diethanolamine. Avoid contact with skin, eyes and respiratory system. If contact with skin, eyes or respiratory system occurs, rinse with water and seek medical advice.
9. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Svar Life Science.



Warning

B.

SUBS

Contains: Diethanolamine

H319:	Causes serious eye irritation.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P305+P351+P338:	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313:	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

**Warning****C.**

SOLN	STOP
------	------

Contains: Sodium hydroxide

H315:	Causes skin irritation.
H319:	Causes serious eye irritation.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P302+P352:	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351+P338:	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P332+P313:	If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
P337+P313:	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

**Warning****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Contains: Sodium azide

H302:	Harmful if swallowed.
EUH032:	Contact with acids liberates very toxic gas.
H412:	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P301+P312:	IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
P273:	Avoid release to the environment.

PREPARATION

Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 550nm filter (540-565nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10 μ L, 100 μ L, 1mL. Automatic pipette to dispense 100 μ L. Automatic pipette to dispense 200 μ L for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1 \times 100mL, 1 \times 400mL.
4. 1mL volume containers.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. Timer for 30 and 60 minutes intervals.

Preparation for the Assay

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18-25° C for 30-60 minutes before use. Mix reagents by gentle inversion.

Do not dilute the Reference Control.

Dilute the following reagents and mix thoroughly.

Reagent	Volume	Add
Wash Buffer Concentrate	1 vial	375mL distilled/deionised water
Sample Diluent 2 Concentrate	1 vial	100mL distilled/deionised water
Positive and Negative Controls/samples	10µL	1mL diluted Sample Diluent 2

Microtitre wells are supplied in strips of eight. If other than a multiple of eight wells are required, proceed as follows.

1. Remove strip from holder by pushing underside of wells.
2. Snap off required number of wells.
3. Hinge rectangular hole into bottom edge (to H) of the holder groove.
4. Ensure the square hole, with nick on left, is firmly held along the top edge (row A).

ASSAY PROTOCOL

Qualitative protocol: run Reference Control, Positive and Negative Controls, and samples.

Quantitative protocol: run Standards (1-5), Positive and Negative Controls, and samples.

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100µL Reference Control/Standards in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls, and pre-diluted patient samples into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed 15 minutes for any one set of Standards/Controls/samples.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Decant strip contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted strips well with paper towels.
5. Wash wells **three times** with a minimum of 200µL diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100µL IgG/IgM Conjugate to each well.
7. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100µL Substrate to each well.
10. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C. **Do not decant.**
11. Add 100µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
12. Read strips within 24 hours at 550nm (540-565nm).

CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

Consider each assay separately when calculating and interpreting results.

Qualitative Protocol

Calculate the absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample.

$$\text{Absorbance Ratio} = \frac{\text{Sample or Control Absorbance Value}}{\text{mean Reference Control Absorbance Value}}$$

Users should calculate a cut-off between positive and negative samples that is specific to their patient populations. Results from the patient populations used in the Svar Life Science clinical trial suggest the following cut-off:

Absorbance Ratio

<0.95

≥0.95 to ≤1.0

>1.0

Result Interpretation

Negative

Borderline - recommend repeat testing

Positive

Quantitative Protocol

Plot the mean absorbance value of each Standard against log₁₀ Standard concentration (see following table) on suitable graph paper. Concentrations of Controls and samples can then be read from the standard curve; a typical plot is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results. 4-parameter logistic (4PL), log/logit or spline curve fits are also satisfactory.

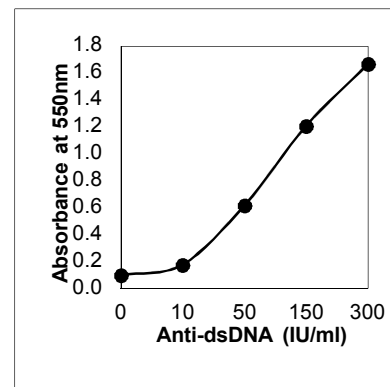
Samples with absorbances above Standard 5 (300 IU/mL) are outside the range of the assay, and should be reported as >300 IU/mL, diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

NB: As in any assay measuring antibodies, this assay determines the activity of the antibody present in the sample, rather than the concentration. Activity can be affected by a number of parameters, such as antibody avidity.

Standard Concentrations

Standard Number	Concentration IU/mL
1	0
2	10
3	50
4	150
5	300

Typical Standard Curve



QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes. Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. It is recommended that the pre-diluted Positive and Negative Controls are run in duplicate in all assays to monitor the quality of the test procedure. Run the ready-to-use Reference Control in duplicate in all qualitative assays.

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of any Control to meet the Control ratio specifications below renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and sample. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below -20° C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Preservatives such as sodium azide at 0.1% (w/v) will not affect sample results.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature. Incidence levels, their relationship to specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

Control Ratio Specifications

Protocol	Specifications
Qualitative (ratios)	$\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$ see Positive Control label
	$\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}} < 0.95$
Quantitative	See Positive Control label for acceptable expected range (IU/mL)
	Negative Control concentration <30 IU/mL

EXPECTED VALUES

The following is a guide to interpreting results. It is recommended that users establish reference ranges for the populations served by their own laboratories.

Anti-dsDNA Range IU/mL	Suggested Interpretation
<30	Negative for antibodies to dsDNA.
≥30 to 50	Borderline for antibodies to dsDNA - possible SLE or other connective tissue disease. Consider other testing for differential diagnosis, e.g. DIASTAT® anti-Sm assay. A repeat dsDNA test should be carried out on a subsequent sample.
>50 to 300	Positive for antibodies to dsDNA - probably SLE.
>300	Strong positive for antibodies to dsDNA - highly diagnostic for SLE.

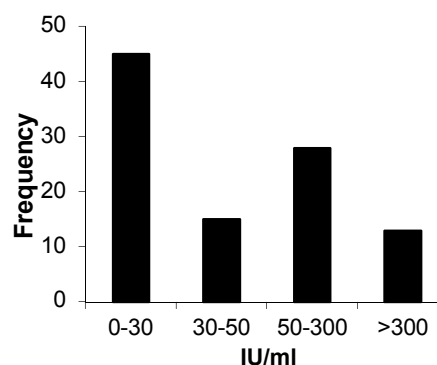
Asymptomatic Samples

192 serum samples from asymptomatic apparently healthy donors were assayed for anti-dsDNA antibody. The negative cut-off was defined as the mean value plus two standard deviations and was calculated to be 30 IU/mL. 190/192 samples (99%) were negative for antibodies to dsDNA using this value.

The asymptomatic reference range was established as <30 IU/mL.

SLE Samples

257 serum samples were obtained from patients with clinically proven SLE. Of these, 142 (55%) were positive by the DIASTAT anti-dsDNA test. The overall frequency distribution of anti-dsDNA antibodies in these SLE patients is illustrated opposite.

**Non-SLE Samples**

A further 119 samples from non-SLE disease groups were assayed. The distribution of results is given in the following table.

Disease	Negative 0-30 IU/mL	Weak Positive 30-50 IU/mL	Positive 50-300 IU/mL
Rheumatoid Arthritis	32	2	1
Polymyositis	22	1	-
Sjögren's Syndrome	25	1	-
Viral Infections	27	1	-
Hypergammaglobulinaemia	6	1	-

PERFORMANCE DATA**Correlation**

338 serum samples (100 asymptomatic, 238 confirmed SLE patients) were assayed in parallel using the DIASTAT® anti-dsDNA kit with a cut-off value of 50 IU/mL and another ELISA with a value of 80 IU/mL. Weak positives as defined by both assays were excluded. The results are shown below.

		DIASTAT		
		+ve	-ve	Total
ELISA	+ve	93	12	105
	-ve	7	226	233
	Total	100	228	338

Overall agreement = 94%.

Good correlation was obtained with DIASTAT® anti-dsDNA and both the Farr radioimmunoassay and Crithidia luciliae immunofluorescence assay.

Dilution Characteristics

Four dilutions of four patient samples were assayed in three assays using three kit batches. The following table shows the mean values obtained and the dilution-corrected recovery.

Sample	Dilution	Mean Value IU/mL	Dilution Corrected % Recovery
1	A	171	100
	A/2	79.5	93
	A/4	39.8	93
	A/8	19.7	92
2	A	487	100
	A/2	211	87
	A/4	116	96
	A/8	57.6	95
3	A	146	100
	A/2	67.1	92
	A/4	33.3	91
	A/8	18.1	99
4	A	154	100
	A/2	89.1	116
	A/4	44.6	116
	A/8	26.5	137

Imprecision

- Intra-assay imprecision** determined by testing three controls, with replication of 12.

Control	Mean Value IU/mL	%CV
1	22.4	6.0
2	66.9	4.6
3	105	4.5

- Inter-assay imprecision** determined by testing three controls in 50 assays, using five operators and three kit batches.

Control	Mean Value IU/mL	%CV
1	22.2	8.7
2	65.3	9.1
3	105	8.1

LIMITATIONS OF USE













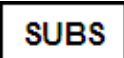
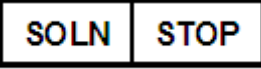
1. Although the presence of high titres of antibodies to dsDNA is indicative of SLE, the data must be considered in light of other clinical and laboratory findings.
2. Some individuals may have high levels of anti-dsDNA antibodies with little or no evidence of clinical disease. By contrast, some patients with SLE may have undetectable levels of these antibodies.
3. While IgG anti-dsDNA antibodies predominate in SLE, IgM anti-dsDNA antibodies can also be found in conjunction with IgG in some samples. Samples that contain high levels of IgM and low levels of IgG may not produce positive results in tests that only measure IgG antibodies¹⁰. This assay is configured to detect both IgG **and** IgM anti-dsDNA antibodies.
4. For repeat patient sampling, e.g. for monitoring, the same type of sample (serum or plasma) should be used throughout the study period.

REFERENCES

1. Tan EM. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. *Adv Immunol*, **33**, 167-240, 1982,
2. Morrow J, Isenberg D. *Autoimmune Rheumatic Diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
3. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. *Adv Immunol*, **44**, 93-151, 1989.
4. Tan EM, Cohen AS, et al. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheum*, **25**, 1271-1277, 1982.
5. Swaak AJG, Grownwold J, et al. Prognostic Value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis*, **41** 388-395, 1982.
6. Smeenk R, Brinkman K, et al. Antibodies to DNA in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Their Role in the Diagnosis, the Follow-up and the Pathogenesis of the Disease. *Clin Rheum*, **9** (1), 100-110, 1990.
7. Borg EJ, Horst G, et al. Measurement of Increases in anti-dsDNA Antibody Levels as a Predictor of Disease Exacerbation in SLE. *Arth Rheum*, **33**, 634-643, 1990.
8. Halbert SP, Karsh J, Anken M. Studies on Autoantibodies to Deoxyribonucleic Acid and Deoxyribonucleoprotein with Enzyme-Immunoassay (ELISA). *J Lab Clin Med*, **97**, 97-111, 1981.
9. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, et al. The First International Standard for Antibodies to Double Stranded DNA. *Ann Rheum Dis*, **47**, 740-746, 1988.
10. Isenberg DA, Schoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple Serologic Reactions and their Relationship to Clinical Activity in Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren's Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, **27**, 132-138, 1984.

SUMMARY OF PROTOCOL

1. Dilute samples and Positive and Negative Controls 1:101. Do not dilute Standards or Reference Control.
2. Add 100µL of Reference Control/Standards in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls and samples into referenced wells of the microtitre strip.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Wash strips 3 times.
5. Add 100µL of IgG/IgM Conjugate to each well.
6. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
7. Wash strips 3 times.
8. Add 100µL of Substrate to each well.
9. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
10. Add 100µL of Stop Solution to each well.
11. Read absorbance at 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.
	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning

BUF	WASH	16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag			dsDNA-coated wells and strip holder / Cupules enduites de ADNdb et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA / dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di dsDNA e supporto per strip / dsDNA-klädda brunnar och striphållare
DIL	SPE	5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL	X		Anti-dsDNA Standards 1-5/ Etalons anti-ADNdb 1-5 / Estandares Anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA Standards 1-5 / Standard anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA-standarder
CONTROL	REF		Anti-dsDNA Reference Control/ Témoïn de référence anti-ADNdb / Control de Referencia Anti-dsDNA / Anti-dsDNA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-dsDNA / Anti-dsDNA referenskontroll
CONTROL	+		Positive Control/ Témoïn positive / Control Positivo / Positiv-Kontrolle / Controllo Positivo / Positiva kontroll
CONTROL	-		Negative Control/ Témoïn negatif / Control Negativo / Negativ-Kontrolle / Controllo negativo / Negativ kontroll

USAGE PREVU

Le test anti-ADNdb DIASTAT® est un dosage immunoenzymatique quantitatif/qualitatif (méthode ELISA) pour la détection des auto-anticorps de la classe IgG et IgM spécifiques de l'ADN double brin (ADNdb) dans le sérum ou le plasma humain. Il est destiné à aider à prononcer le diagnostic de lupus érythémateux aigu disséminé, et à contrôler les taux d'anticorps anti-ADNdb durant le traitement et la rémission, bien que son résultat à lui seul ne permette pas de poser un tel diagnostic. Les taux d'auto-anticorps représentent un paramètre dans un procédé diagnostique à plusieurs critères.

INTRODUCTION





Les affections rhumatismales générales sont des affections auto-immunes telles le lupus érythémateux aigu disséminé (LEAD), la polyarthrite rhumatoïde et la connectivite mixte (CM). Une caractéristique générale des affections rhumatismales générales est la présence d'anticorps en circulation dirigés contre une variété d'antigènes cellulaires. La détection et la caractérisation sérologique d'auto-anticorps spécifiques jouent un rôle important en ce qui concerne le diagnostic différentiel de ces maladies^{1,2}. Les anticorps anti-ADNdb sont très spécifiques pour le LEAD, et ils sont détectés très fréquemment chez des patients non traités avec une maladie évolutive³. La présence d'anticorps anti-ADNdb dans le LEAD est l'un des critères de la classification des maladies de l'Association des Rhumatismes Américaine⁴. Plusieurs investigateurs ont rapporté une corrélation entre l'activité pathologique et les fluctuations des taux d'anticorps^{5,6}, de ce fait, le contrôle de l'activité de l'ADNdb est considéré utile dans le traitement des patients avec LEAD⁷.

On dispose d'un certain nombre de techniques pour détecter les auto-anticorps anti-ADNdb, parmi lesquelles le radio-immunos dosage Farr et le dosage immunofluorescent à *Crithidia luciliae*. Ces tests ont des désavantages inhérents en raison de leur complexité, de leur manque de sensibilité et de reproductibilité. Les dosages par méthode ELISA offrent simplicité, sensibilité, reproductibilité, et objectivité par rapport aux autres méthodes⁸ et ils peuvent être normalisés par comparaison avec l'étalon anti-ADNdb de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Wo/80⁹.

PRINCIPE DU DOSAGE

Les cupules des bandes de microtitrage sont enduites d'une préparation de thymus de veau choisi en raison de sa forte teneur en ADNdb. Durant la première incubation, les auto-anticorps qui se trouvent dans le sérum ou le plasma dilué se fixent à la surface enduite d'antigène. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les constituants non fixés. Durant la seconde incubation, le Conjugué, les anticorps marqués avec une enzyme et dirigés contre IgG et IgM humaines se fixent aux auto-anticorps liés à la surface quelconques. Après un autre lavage, les auto-anticorps spécifiques sont dépistés par incubation avec le Substrat. L'addition de la Solution d'arrêt met fin à la réaction, et on obtient alors un produit final coloré. La quantité de Conjugué fixé est mesurée en unités d'absorption. Dans le protocole qualitatif, la quantité de Conjugué qui a été fixée par l'échantillon est comparée à celle qui a été fixée par le Témoin de référence. Dans le protocole quantitatif, la concentration des auto-anticorps anti-ADNdb peut être estimée par interpolation à partir d'une courbe dose-effet basée sur les Etalons. Les Etalons sont comparés à la Préparation Témoin de l'OMS Wo/80 et les résultats sont exprimés en unités internationales par mL (UI/mL).

CONSTITUANTS DU NECESSAIRE

A	IgG/IgM Conjugué	1 × 15mL	Anticorps marqués à la phosphatase alcaline, et dirigés contre l'IgG et IgM humaine, tampon Tris, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
B	Substrat	1 × 15mL	Mg ²⁺ , monophosphate de phénolphtaléine (MPP), solution tampon. Prêt à l'emploi. Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation.	
C	Solution d'Arrêt	1 × 15mL	Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH >10). Prêt à l'emploi.	
D	Tampon de lavage concentré (16X)	2 × 25mL	Tampon borate, azoture de sodium à 0,4 % (p/v). Diluer avant l'usage.	
E	Cupules enduites de ADNdb et Porte-bandes	12 bandes de microtitrage à 8 cupules	Enduites d'antigène associé à l'ADNdb, dans une poche en aluminium refermable contenant un desséchant. Codées VERT CITRON . Des cupules individuelles peuvent être détachées de chaque bande de microtitrage.	
F	Diluant pour échantillons 2 concentré (5X)	1 × 25mL	Tampon phosphate, stabilisateur des protéines, Triton X-100 à 5 % (p/v), azoture de sodium à 0,5 % (p/v). Diluer avant l'usage.	
1-5	Etalons anti-ADNdb	5 × 1.0mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). 0, 10, 50, 150, 300 IU/mL. Prêt à l'emploi.	
6	Témoin de référence anti-ADNdb	1 × 1.5mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
+/-	Témoin positif Témoin négatif	1 × 0,2mL 1 × 0,1mL	Plasma humain, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Diluer à 1 % avec le diluant 2 pour échantillons dilué avant l'usage, comme pour les échantillons.	
	Notice incluse dans le conditionnement			

CONSERVATION DES REACTIFS

Stabilité du nécessaire déjà ouvert

Un kit a été ouvert et réutilisé à trois occasions sur une période de trois mois, et cela n'a pas affecté sa performance.

Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2-8° C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les nécessaires.
4. Diluer le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant 2 pour échantillons et les Témoins négatifs et positifs avant l'usage. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le tampon de lavage dilué et le Diluant dilué pour échantillons restent stables pendant un maximum de 6 mois à 2-8° C si toute contamination microbienne est évitée.
6. Remettre les bandes de microtitrage non utilisées dans la poche d'aluminium contenant du desséchant, et conserver à 2-8° C, jusqu'à ce que l'on en est besoin.
7. Le porte-plaques a été adapté pour n'être utilisé qu'avec des cupules détachables par cassure nette.
8. Ne pas exposer le Substrat à la lumière durant la conservation.
9. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.

Indications d'une détérioration

Le Substrat doit être d'une couleur jaune pâle. Une couleur rose indique qu'il y a eu contamination et le réactif doit alors être jeté. Un trouble ou une précipitation dans n'importe quel constituant indique qu'il y a eu détérioration et le constituant doit être jeté.

Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage est recommandé pour des échantillons de sérum/plasma ; ne pas utiliser des échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons peuvent être analysés dans les 12 heures suivant leur prélèvement, ou bien ils peuvent être conservés à $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Réservé à l'usage diagnostique in vitro.

Précautions de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. Les Étalons et les Témoins contiennent du plasma humain testé avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, du virus HCV, de l'antigène associé au VIH et d'anticorps anti-VIH, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Étant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si les Étalons et les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance potentiellement biologiquement dangereuse. Le Manuel de Santé du Centre épidémiologique/des Instituts nationaux de la santé (CDC/NIH), intitulé "Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux", 3^{ème} édition, 1993, décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux États-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toutes éruptions cutanées, coupures, abrasions et autres lésions cutanées de manière adéquate.
6. Les Étalons, Témoins, Conjugué, Concentré diluant 2 pour échantillons et Concentré tampon de lavage contiennent tous de l'azote de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azote.
7. La Solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Disperser tout déversement avec de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, irriguer avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. Le substrat contient du PMP, du Bronidox L et de la diéthanolamine. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires. En cas de contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires, laver avec de l'eau et consulter un médecin.
9. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès de Svar Life Science.

**B.**

SUBS

Attention

Contient: Diéthanolamine

- H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

**C.**

SOLN STOP

Attention

Contient: Hydroxyde de sodium

- H315: Provoque une irritation cutanée.
 H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
 P332+P313: En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

**D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attention

Contient: Azoture de sodium

- H302: Nocif en cas d'ingestion.
 EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
 H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P301+P312: EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
 P273: Éviter le rejet dans l'environnement.

PREPARATION

Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire

1. Lecteur de plaque/bande à 96 cupules, avec filtre de 550nm (540-565nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10µL, 100µL, 1mL. Pipette automatique pour distribuer 100µL. Pipette automatique pour distribuer 200µL pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Eprouvettes graduées en verre/matière plastique : 1×100mL, 1×400mL.
4. Récipients contenant 1mL.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation pour le dosage

Attendre 30 à 60 minutes pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18-25° C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

Ne pas diluer le Témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

Réactif	Volume	Ajouter
Concentré tampon de lavage	1 flacon	375mL d'eau distillée/désionisée
Concentré diluant 2 pour échantillons	1 flacon	100mL d'eau distillée/désionisée
Témoins positifs et négatifs/échantillons	10 µL	1mL de Diluant 2 dilué pour échantillons

Les cupules de microtitrage sont fournies en bandes de huit. Si on a besoin d'un nombre de cupules qui n'est pas un multiple de huit, procéder de la manière suivante :

1. Sortir la bande du porte-bandes en poussant sous les cupules.
2. Séparer le nombre requis de cupules de la bande en cassant net.
3. Glisser le trou rectangulaire dans la bordure du bas (en H) de la rainure du porte-bandes.
4. S'assurer que le trou carré, avec l'encoche à gauche, est fermement maintenu le long de la bordure supérieure (rangée A).

PROTOCOLE DU DOSAGE

Protocole qualitatif: analyser le Témoin de référence, les Témoins positifs et négatifs et les échantillons.

Protocole quantitatif: analyser les Etalons (1-5), les Témoins positifs et négatifs, et les échantillons.

1. Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
2. Avec une pipette, prélever 100µL du Témoin de référence/des Etalons, en double exemplaire, des Témoins positifs et négatifs et des échantillons du patient prédilués, puis déposer dans les cupules appropriées. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette pour chaque addition. Cette étape ne doit pas prendre plus de 15 minutes pour n'importe quel groupe d'Etalons/Témoins/échantillons.
3. Faire incubé pendant 60 ± 10 minutes à 18-25° C.
4. Décanter le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
5. Laver les cupules **trois fois** avec un minimum de 200µL de Tampon de lavage. **Décanter et éponger après chaque étape du lavage.**

6. Ajouter 100µL de Conjugué IgG/IgM dans chaque cupule.
7. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
10. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C. **Ne pas décanter.**
11. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
12. Lire les résultats indiqués sur les bandes après 24 heures à 550nm (540-565nm).

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.

Protocole qualitatif

Calculer le coefficient d'absorption (densité optique) pour les Témoins positifs et négatifs, et pour chaque échantillon.

$$\text{Coefficient d'absorption} = \frac{\text{Valeur d'absorption de l'échantillon ou du Témoin}}{\text{Valeur d'absorption moyenne du Témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer une valeur seuil entre les échantillons positifs et négatifs qui est spécifique de leurs populations de patients. Les résultats obtenus des populations de patients utilisées dans l'essai clinique Svar Life Science suggèrent la valeur seuil suivante:

<u>Coefficient d'absorption</u>	<u>Interprétation des résultats</u>
<0,95	Négatif
≥0,95 à ≤1,0	Valeur limite - il est recommandé de refaire le test
>1,0	Positif

Protocole quantitatif

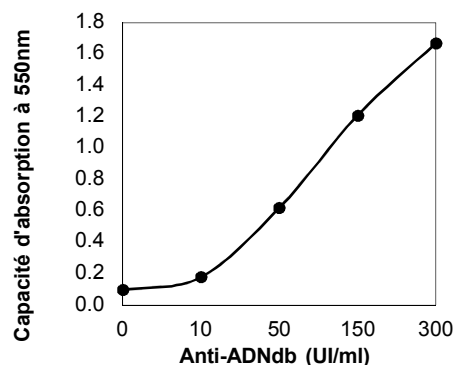
Sur du papier millimétré, tracer la valeur d'absorption de chaque Etalon en fonction de la concentration Etalon log₁₀ (voir tableau ci-dessous). Les concentrations des Témoins et des échantillons peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage ; à titre de référence, une courbe type est illustrée ci-dessous, mais elle ne doit pas être utilisée pour interpréter les résultats. Des ajustements de courbe par logistique pondérée à 4 paramètres (4PL), log/logit ou spline sont aussi satisfaisants.

Les échantillons dont l'absorption est supérieure à l'Etalon 5 (300UI/mL) dépassent les limites du dosage, et ils doivent être considérés comme >300UI/mL, être dilués et re-analysés, en apportant la rectification nécessaire pour cet autre facteur de dilution.

NB: Comme avec tout dosage mesurant des anticorps, ce dosage détermine l'activité de l'anticorps présent dans l'échantillon, et non la concentration. L'activité peut être affectée par plusieurs paramètres, parmi lesquels l'avidité des anticorps.

Concentrations des étalons

Numéro de l'Étalon	Concentration UI/mL
1	0
2	10
3	50
4	150
5	300

Courbe d'étalonnage type**CONTROLE DE LA QUALITE**

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte. Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Sections sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre.

Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Il est recommandé que les témoins positifs et négatifs prédilués soient analysés en double exemplaire dans tous les dosages afin de contrôler la qualité de la méthode de test. Analyser le Témoin de référence prêt à l'emploi en deux exemplaires dans tous les dosages qualitatifs.

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications du coefficient des Témoins indiquées ci-dessous, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Les agents de conservation tels que l'azoture de sodium n'affecteront pas les résultats obtenus avec les échantillons.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne reflèteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

Spécifications des coefficients des Témoins

Protocole	Spécifications
Qualitatif (coefficients)	$\frac{\text{Absorption du Témoin positif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}}$ voir étiquette du Témoin positif
	$\frac{\text{Absorption du Témoin négatif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}} < 0,95$
Quantitatif	Se référer à l'étiquette du Témoin positif pour les limites attendues acceptables (IU/mL)
	Concentration du Témoin négatif < 30 IU/mL

VALEURS ATTENDUES

Le tableau suivant sert de guide pour interpréter les résultats. Il est recommandé aux utilisateurs de déterminer des limites de référence pour les populations pour qui ils font les tests dans leurs propres laboratoires.

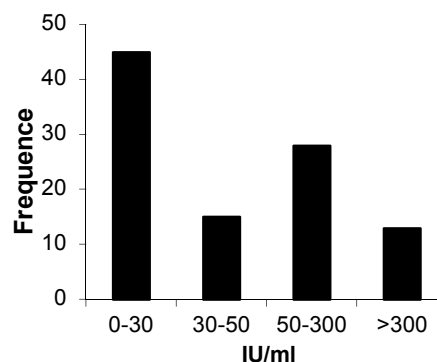
Limites anti-ADNdb UI/mL	Interprétation suggérée
<30	Négatif pour anticorps anti-ADNdb.
≥30 à 50	Valeur limite pour les anticorps anti-ADNdb - possibilité de LEAD ou d'une autre affection des tissus connectifs. Envisager de faire un autre test pour un diagnostic différentiel, par ex. dosage anti-Sm DIASTAT® . Répéter le test ADN double brin avec un échantillon ultérieur.
>50 à 300	Positif pour anticorps anti-ADNdb - probabilité de LEAD
>300	Positif prononcé pour les anticorps anti-ADNdb - diagnostique certain de LEAD.

Echantillons asymptomatiques

192 échantillons sériques provenant de donneurs asymptomatiques apparemment en bonne santé ont été analysés pour détecter la présence éventuelle d'anticorps anti-ADNdb. Le seuil négatif était défini comme la valeur moyenne plus deux écart-types et évalué à 30 UI/mL.

190/192 échantillons (99 %) étaient négatifs pour les anticorps anti-ADNdb en utilisant cette valeur.

La limite de référence pour individus asymptomatiques a été déterminée comme étant <30 IU/mL.



Echantillons avec LEAD

257 échantillons sériques ont été obtenus de patients avec LEAD confirmé cliniquement. Sur ces 257 échantillons, 142 (55 %) étaient positifs avec le test anti-ADNdb DIASTAT. La répartition de la fréquence générale des anticorps anti-ADNdb chez ces patients avec LEAD est illustrée à côté.

Echantillons sans LEAD

119 échantillons supplémentaires provenant de groupes sans LEAD ont été analysés. La répartition des résultats est donnée dans le tableau suivant :

Affection	Négatif 0-30 UI/mL	Faible positif 30-50 UI/mL	Positif 50-300 UI/mL
Polyarthrite rhumatoïde	32	2	1
Polymyosite	22	1	-
Syndrome de Sjögren	25	1	-
Infections virales	27	1	-
Hypergammaglobulinémie	6	1	-

DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE

Corrélation

338 échantillons sériques (100 asymptomatiques, 238 patients avec LEAD confirmé) ont été analysés en parallèle avec le nécessaire anti-ADNdb DIASTAT[®] ayant une valeur seuil de 50 UI/mL et un autre dosage ELISA ayant une valeur de 80 UI/mL. Les résultats faibles positifs, tels que définis dans les deux dosages, ont été exclus. Les résultats sont indiqués ci-dessous :

		DIASTAT [®]		
		+ve	-ve	Total
ELISA	+ve	93	12	105
	-ve	7	226	233
	Total	100	228	338

Concordance générale = 94%.

On a obtenu une bonne corrélation avec le test anti-ADNdb DIASTAT[®] et avec le radio-immunodosage Farr et le dosage immunofluorescent à *Crithidia luciliae*.

Caractéristiques de la dilution

Quatre dilutions de quatre échantillons provenant de patients ont été analysées dans trois dosages en utilisant trois lots de nécessaires. Le tableau suivant indique les valeurs moyennes obtenues et le pourcentage récupéré rectifié en fonction de la dilution.

Echantillon	Dilution	Valeur moyenne UI/mL	% récupéré rectifié en fonction de la dilution
1	A	171	100
	A/2	79,5	93
	A/4	39,8	93
	A/8	19,7	92
2	A	487	100
	A/2	211	87
	A/4	116	96
	A/8	57,6	95
3	A	146	100
	A/2	67,1	92
	A/4	33,3	91
	A/8	18,1	99
4	A	154	100
	A/2	89,1	116
	A/4	44,6	116
	A/8	26,5	137

Imprécision

1. **Imprécision intra-dosages** déterminée en testant trois témoins, avec réplication de douze.

Témoin	Valeur moyenne UI/mL	%CV
1	22,4	6,0
2	66,9	4,6
3	105	4,5

2. **Imprécision inter-dosages** déterminée en testant de trois témoins dans 50 dosages, en utilisant cinq laborantins et trois lots de nécessaires.

Témoin	Valeur moyenne UI/mL	%CV
1	22,2	8,7
2	65,3	9,1
3	105	8,1

RESTRICTIONS D'UTILISATION













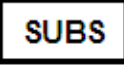
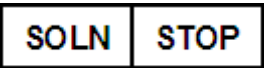
1. Bien que la présence de taux élevés d'anticorps dirigés contre l'ADNdb indique la présence de LEAD, les données doivent être considérées en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques.
2. Chez certains individus, il peut y avoir des taux élevés d'anticorps anti-ADNdb mais peu ou pas de preuves d'une affection clinique. Par contre, il se peut que des patients atteints de LEAD aient des taux indétectables de ces anticorps.
3. Bien que les anticorps anti-ADNdb de la classe IgG prédominent dans le LEAD, on peut aussi trouver des anticorps anti-ADNdb de la classe IgM conjointement avec ceux de la classe IgG dans certains échantillons. Les échantillons qui contiennent des taux élevés d'IgM et de faibles taux d'IgG risquent de ne pas produire des résultats positifs dans les tests qui ne mesurent que les anticorps de la classe IgG¹⁰. Ce dosage a été conçu pour détecter à la fois les anticorps anti-ADNdb à la fois de la classe IgG et de la classe IgM.
4. Pour des échantillonnages répétitifs chez un patient, par ex. à des fins de monitoring, le même type d'échantillon (sérum ou plasma) doit être utilisé durant toute la période d'étude.

REFERENCES

1. Tan EM. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. *Adv Immunol*, **33**, 167-240, 1982,
2. Morrow J, Isenberg D. *Autoimmune Rheumatic Diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
3. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. *Adv Immunol*, **44**, 93-151, 1989.
4. Tan EM, Cohen AS, et al. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheum*, **25**, 1271-1277, 1982.
5. Swaak AJG, Grownwold J, et al. Prognostic Value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis*, **41** 388-395, 1982.
6. Smeenk R, Brinkman K, et al. Antibodies to DNA in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Their Role in the Diagnosis, the Follow-up and the Pathogenesis of the Disease. *Clin Rheum*, **9** (1), 100-110, 1990.
7. Borg EJ, Horst G, et al. Measurement of Increases in anti-dsDNA Antibody Levels as a Predictor of Disease Exacerbation in SLE. *Arth Rheum*, **33**, 634-643, 1990.
8. Halbert SP, Karsh J, Anken M. Studies on Autoantibodies to Deoxyribonucleic Acid and Deoxyribonucleoprotein with Enzyme-Immunoassay (ELISA). *J Lab Clin Med*, **97**, 97-111, 1981.
9. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, et al. The First International Standard for Antibodies to Double Stranded DNA. *Ann Rheum Dis*, **47**, 740-746, 1988.
10. Isenberg DA, Schoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple Serologic Reactions and their Relationship to Clinical Activity in Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren's Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, **27**, 132-138, 1984.

RESUME DU PROTOCOLE

1. Diluer les échantillons et les Témoins positifs et négatifs à raison de 1:101. Ne pas diluer les Etalons ou le Témoin de référence.
2. Ajouter 100µL de Témoin de référence/Etalons en double exemplaire, de Témoins positifs et négatifs et d'échantillons prédilués dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25°C.
4. Laver les bandes 3 fois.
5. Ajouter 100µL de Conjugué IgG/IgM dans chaque cupule.
6. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
7. Laver les bandes 3 fois.
8. Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
9. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25°C.
10. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule.
11. Lire la capacité d'absorption à 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.
	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning

BUF	WASH	16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag			dsDNA-coated wells and strip holder / Cupules enduites de ADNdb et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA / dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di dsDNA e supporto per strip / dsDNA-klädda brunnar och striphållare
DIL	SPE	5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL	X		Anti-dsDNA Standards 1-5/ Etalons anti-ADNdb 1-5 / Estandares Anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA Standards 1-5 / Standard anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA-standarder
CONTROL	REF		Anti-dsDNA Reference Control/ Témoïn de référence anti-ADNdb / Control de Referencia Anti-dsDNA / Anti-dsDNA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-dsDNA / Anti-dsDNA referenskontroll
CONTROL	+		Positive Control/ Témoïn positive / Control Positivo / Positiv-Kontrolle / Controllo Positivo / Positiva kontroll
CONTROL	-		Negative Control/ Témoïn negatif / Control Negativo / Negativ-Kontrolle / Controllo negativo / Negativ kontroll

USO PREVISTO

La prueba anti-dsDNA DIASTAT® es un análisis inmunsorbente con anticuerpo ligado a enzima (ELISA) cuantitativo/cualitativo para la detección de autoanticuerpos IgG e IgM específicos para el ADN de doble hélice (dsDNA) en plasma o suero humano. Se utiliza como ayuda para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico, y para monitorizar los niveles de anticuerpos dsDNA durante el tratamiento y la remisión, y no es definitiva por sí sola. Los niveles de autoanticuerpos representan un parámetro de un proceso diagnóstico de múltiples criterios.

INTRODUCCIÓN





Las enfermedades reumáticas sistémicas son trastornos autoinmunes, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoidea y enfermedad mixta del tejido conjuntivo. Una característica general de las enfermedades reumáticas sistémicas es la presencia de anticuerpos circulantes a diversos antígenos celulares. La detección y la caracterización serológica de autoanticuerpos específicos desempeña un papel importante en el diagnóstico diferencial de estas enfermedades^{1,2}. Los anticuerpos contra dsDNA son altamente específicos para el LES y se detectan con gran frecuencia en pacientes no tratados con enfermedad activa³. La presencia de anticuerpos dsDNA en el LES es uno de los criterios para la clasificación de la enfermedad según la Asociación Americana para el Reumatismo⁴. Varios investigadores han señalado una correlación entre la actividad de la enfermedad y fluctuaciones en los niveles de anticuerpos^{5,6}; por consiguiente, la monitorización de la actividad dsDNA se considera relevante para el tratamiento de los pacientes con LES⁷.

Se dispone de cierto número de técnicas para la detección de los autoanticuerpos dsDNA, incluido el radioinmunoanálisis Farr y el análisis por inmunofluorescencia *Crithidia luciliae*. Estas pruebas presentan inconvenientes inherentes por su complejidad, falta de sensibilidad y reproductibilidad. Los ELISAs ofrecen simplicidad, sensibilidad, reproductibilidad y objetividad en relación con otros métodos⁸, y pueden normalizarse por referencia al estándar anti-dsDNA de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Wo/80⁹.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los vasos de las bandas de microtitulación se recubren con una preparación de timo de becerro seleccionado por su elevado contenido de dsDNA. Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos en plasma o suero diluido se fijan a la superficie recubierta con el antígeno. A continuación, se lavan los vasos para eliminar los componentes no fijados. En la segunda incubación, el Conjugado, anticuerpos marcados con enzima a IgG e IgM humanas, se fija a cualquier autoanticuerpo fijado a la superficie. Después de otro lavado, se determinan los autoanticuerpos específicos mediante la incubación con el Substrato. El añadido de la Solución de Parada finaliza la reacción, produciendo un producto final coloreado. La cantidad de Conjugado fijado se mide en unidades de absorbencia. En el protocolo cualitativo, la cantidad de Conjugado fijado por la muestra se compara con la fijada por el Control de Referencia. En el protocolo cuantitativo, la concentración de autoanticuerpo anti-dsDNA puede calcularse por interpolación a partir de una curva dosis-respuesta basada en los Estándares. Los Estándares se refieren en comparación con la Preparación de Referencia de la Oms Wo/80 y se indican en unidades Internacionales por mL (IU/mL).

COMPONENTES DEL KIT

A	Conjugado IgG/IgM	1 × 15mL	Anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina a IgG e IgM humana, búfer Tris, estabilizador de proteínas, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
B	Sustrato	1 × 15mL	Mg ²⁺ , monofosfato de fenolftaleína (PMP), solución de búfer. Listo para su uso. No exponer a la luz durante el almacenamiento.	
C	Solución de Parada	1 × 15mL	Hidróxido de sodio, EDTA, búfer carbonatado (pH >10). Listo para su uso.	
D	Concentrado de Búfer de Lavado (16X)	2 × 25mL	Búfer boratado, 0,4% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
E	Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA	12 × 8 bandas de microtitulación de vasos	Recubiertos con antígeno dsDNA, en un paquete metalizado y resellable con desecante. Código de colores VERDE LIMA . Los vasos individuales pueden separarse de cada banda de microtitulación.	
F	Concentrado de Diluyente de Muestra 2 (5X)	1 × 25mL	Búfer fosfatado, estabilizador de proteínas, 5% (c/v) Trixton X-100, 0,5% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
1-5	Estándares Anti-dsDNA	5 × 1,0mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. 0, 10, 50, 150, 300 IU/mL. Listo para su uso.	
6	Control de Referencia Anti-dsDNA	1 × 1,5mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
+/-	Control Negativo Control Positivo	1 × 0,2 mL 1 × 0,1mL	Plasma humano, <0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1:101 con Diluyente de Muestra diluido 2 antes de su uso, por lo que respecta a las muestras.	
	Folleto del Paquete			

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Estabilidad del Kit Una Vez Abierto

Un kit fue abierto y reutilizado en tres ocasiones durante un período de tres meses sin efectos adversos sobre la eficacia del mismo.

Notas sobre la Manipulación y los Procedimientos

1. Guardar los componentes del kit a 2-8° C y utilizar hasta la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas. No utilizar reactivos caducados.
2. No mezclar números de lote diferentes.
3. No congelar los kits.
4. El Concentrado de Búfer de Lavado, el Concentrado de Diluyente de Muestra 2 y los Controles Positivos y Negativos, deben diluirse antes de su utilización. Todo el resto de reactivos están listos para ser usados.
5. El Búfer de Lavado diluido y el Diluyente de Muestra 2 diluido son estables a 2-8° C hasta 6 meses, si se evita la contaminación microbiana.
6. Volver a colocar las bandas de microtitulación sobrantes en el paquete metálico y guardar con el producto desecante a 2-8° C hasta su reutilización.
7. El soporte para placas está adaptado para ser utilizado únicamente con vasos encajables.
8. No exponer el Substrato a la luz durante el almacenamiento.
9. Evitar la contaminación de reactivos. Utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada manipulación de muestra o reactivo.

Signos de Deterioro

El Substrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo. La turbiedad o precipitación en cualquier componente indica deterioro y hay que desechar el componente.

Recogida y Almacenamiento de Muestras

El análisis está recomendado para muestras de suero/plasma; no utilizar muestras turbias, hemolizadas ni lipémicas. Mezclar minuciosamente las muestras descongeladas antes del análisis y no volver a congelar/descongelar. No calentar las muestras inactivadas, ya que esto podría producir resultados falsos positivos.

Las muestras deben analizarse en un plazo de 12 horas desde su obtención, o pueden almacenarse a una temperatura igual o inferior a -20°C .

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Únicamente para uso diagnóstico in vitro.

Precauciones de Seguridad

1. Siga estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente las relativas a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Los Estándares y los Controles contienen plasma humano al que se han realizado pruebas con análisis aprobados por la FDA para antígeno de superficie de la hepatitis B, VHC, antígeno VIH y anticuerpos VIH y cuyos resultados han sido no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece una garantía total de que no estén presentes agentes infecciosos, hay que considerar los Estándares y los Controles como potencialmente infecciosos y manipularlos con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. El Manual de Salud CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ª edición, 1993, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
3. No pipetar con la boca.
4. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
5. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes y abrasiones de la piel así como otras lesiones dermatológicas.
6. Los Estándares, los Controles, el Conjugado, el Concentrado de Diluyente de Muestra 2 y el Concentrado de Búfer de Lavado contienen azida sódica, que puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas extremadamente explosivas. Para su eliminación, verter con grandes cantidades de agua para impedir la formación de azida.
7. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si se produce contacto con piel u ojos, lavar con agua y acudir inmediatamente a un médico.
8. El sustrato contiene PMP, Bronidox L, y Dietanolamina. Evite el contacto con la piel, los ojos y mucosas. Si se produce contacto con la piel, los ojos o mucosas, aclárelos con agua y consulte con su médico.
9. Pueden solicitarse a Svar Life Science las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



B.

SUBS

Atención

Contiene: Dietanolamina

- H319: Provoca irritación ocular grave.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



C.

SOLN	STOP
------	------

Atención

Contiene: Hidróxido de sodio

- H315: Provoca irritación cutánea.
 H319: Provoca irritación ocular grave.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
 P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
 P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Atención

Contiene: Azida sódica

- H302: Nocivo en caso de ingestión.
 EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
 H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si se encuentra mal.
 P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

PREPARACIÓN

Materiales/Equipos Necesarios No Suministrados

1. Lector de banda/placa de vasos 96 con filtro 550 nm (es aceptable 540-565 nm).
2. Pipetas de precisión para dispensar 10 µL, 100 µL, 1mL. Pipeta automática para dispensar 100 µL. Pipeta automática para dispensar 200 µL para el lavado manual; lavador automático de placa opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Recipientes con volumen 1mL.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallitas de papel.
7. Cronómetro para intervalos de 30 y 60 minutos.

Preparativos para el Análisis

Dejar que todos los componentes del kit, incluidas las bandas de microtitulación, se templen a 18-25° C durante 30-60 minutos antes de su utilización. Mezclar los reactivos mediante una suave inversión.

No diluir el Control de Referencia.

Diluir los siguientes reactivos y mezclar minuciosamente.

Reactivo	Volumen	Añadir
Concentrado de Búfer de Lavado	1 vial	375mL de agua destilada/desionizada
Concentrado de Diluyente de Muestra 2	1 vial	100 mL de agua destilada/desionizada
Muestras/Controles Positivos y Negativos	10 µL	1mL de Diluyente de Muestra 2 diluido

Los vasos de microtitulación se suministran en bandas de ocho unidades. Si es necesario un número de vasos no múltiplo de ocho, proceda del siguiente modo.

1. Extraiga la banda del soporte presionando el fondo de los vasos.
2. Desencaje el número necesario de vasos.
3. Encaje el orificio rectangular en el borde inferior (a H) de la ranura del soporte.
4. Compruebe que el orificio cuadrado, con la muesca a la izquierda, está firmemente sujeto en todo el borde superior (fila A).

PROTOCOLO DEL ANÁLISIS

Protocolo Cualitativo: realice el Control de referencia, los Controles Positivos y Negativos y las muestras.

Protocolo Cuantitativo: realice los Estándares (1-5), los Controles Positivos y Negativos y las muestras.

1. Vasos de referencia para identificación.
2. Pipetar 100µ de Estándares/Control de Referencia por duplicado, Controles Negativos y Positivos prediluidos, y muestras de pacientes prediluidas, en los vasos apropiados. No olvide cambiar las puntas de las pipetas entre añadidos. Esta fase no debe durar más de 15 minutos para ningún conjunto de Estándares/Controles/muestras.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Decantar el contenido de la banda mediante inversión rápida sobre un lavabo adecuado para la eliminación de materiales biológicos, teniendo presente el potencial riesgo infeccioso de las muestras. Secar los vasos de las bandas invertidas con toallitas de papel.
5. Lave los vasos **tres veces** con un mínimo de 200µL de Búfer de Lavado diluido. **Decantar y secar después de cada fase de lavado.**
6. Añadir 100µ IgG/IgM de Conjugado a cada vaso.
7. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
8. Repetir los pasos 4 y 5.

9. Añadir 100 µL de Substrato a cada vaso.
10. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C. **No decantar.**
11. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada vaso, en el mismo orden y ritmo que el Substrato. Agitar los vasos con suavidad para mezclar.
12. Leer las bandas a las 24 horas a 550 nm (540-565 nm).

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Considerar cada análisis de forma independiente a la hora de calcular e interpretar los resultados.

Protocolo Cualitativo

Calcular el valor de la tasa de absorbencia (densidad óptica) para los Controles Positivos y Negativos, así como para cada muestra.

$$\text{Tasa de Absorbencia} = \frac{\text{Muestra o Valor de Absorbencia del Control}}{\text{Valor de Absorbencia del Control de Referencia promedio}}$$

Los usuarios deben calcular un límite entre las muestras positivas y negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes utilizadas en la prueba clínica Svar Life Science sugieren el siguiente límite:

<u>Tasa de Absorbencia</u>	<u>Interpretación del Resultado</u>
<0,95	Negativo
≥0,95 a ≤1,0	Borderline – se recomienda repetir la prueba
>1,0	Positivo

Protocolo Cuantitativo

Calcular el valor promedio de absorbencia de cada Estándar y realizar un gráfico de comparación con la concentración Estándar log₁₀ (véase la siguiente tabla) en un papel cuadrículado adecuado.

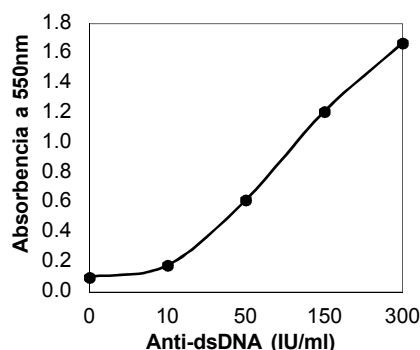
Posteriormente, pueden leerse las concentraciones de los Controles y las muestras a partir de la curva estándar; a continuación aparece como referencia un gráfico típico; no debe utilizarse para interpretar los resultados. También son satisfactorios la logística de 4 parámetros (4PL) y la curva uniforme o de logaritmo/logit.

Las muestras con absorbencias superiores al Estándar 5 (300 IU/mL) quedan fuera del rango del análisis y deben señalarse como corrección del factor de dilución >300 IU/mL, diluido y nuevamente analizado.

NOTA: Como en todos los análisis que miden anticuerpos, este análisis determina la actividad del anticuerpo presente en la muestra, no la concentración. La actividad puede verse afectada por cierto número de parámetros, por ejemplo, la avidéz de los anticuerpos.

Concentraciones de los Estándares

Número de Estándar	Concentración IU/mL
1	0
2	10
3	50
4	150
5	300

Curva de Estándares Típica**CONTROL DE CALIDAD**

Comprobar que se lleva a cabo un mantenimiento y una calibración de lector de placa apropiados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que se utiliza la longitud de onda correcta.

Los usuarios deben garantizar que están totalmente familiarizados con las instrucciones para la realización del análisis, especialmente la sección de Advertencias y Precauciones y las Notas sobre Manipulación y Procedimientos. Los usuarios deben demostrar que pueden obtener especificaciones de rendimiento precisas y una gama comunicable de resultados de la prueba comparables a los determinados por el fabricante antes de comunicar resultados de pruebas en pacientes. Se recomienda realizar los Controles Negativos y Positivos prediluidos por duplicado en todos los análisis con el fin de monitorizar la calidad del procedimiento de la prueba. Realizar el Control de Referencia listo para su uso por duplicado en todos los análisis Cualitativos.

Suponiendo que se cumplen las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, si alguno de los Controles no cumple las especificaciones de tasa de Control que aparecen a continuación, esto anula el ensayo y no deben proporcionarse los datos de este paciente. El operario puede repetir el análisis, tras haber revisado el procedimiento, o ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Para repetir el análisis, prepare una dilución nueva de cada Control y muestra. Los laboratorios pueden querer incluir controles internos en cada realización del análisis. Guardar dicho material de control a o por debajo de -20°C y evitar repetir los ciclos de congelación/descongelación. Los conservantes tales como la azida sódica a 0,1 % (c/v) no afectarán a los resultados de la muestra.

Los niveles analíticos identificados en determinadas enfermedades son los establecidos por el fabricante para poblaciones específicas y no reflejan necesariamente la literatura. Los niveles de incidencia, su relación con enfermedades específicas, los rangos de referencia y los valores límite apropiados deben calcularse para las poblaciones específicas atendidas por los usuarios.

Especificaciones de Tasa de Control

Protocolo	Especificaciones
Cualitativo (proporciones)	$\frac{\text{Absorbancia de Control Positivo}}{\text{Absorbancia de Control de Referencia}}$ Véase etiqueta de Control Positivo
	$\frac{\text{Absorbancia de Control Negativo}}{\text{Absorbancia de Control de Referencia}}$ <0,95
Cuantitativo	Véase en la etiqueta de Control Positivo la gama aceptable prevista (IU/mL)
	Concentración de Control Negativo <30 IU/mL

VALORES PREVISTOS

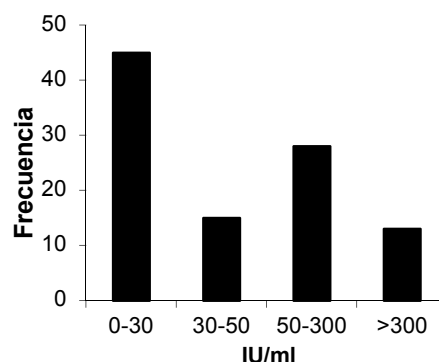
A continuación se proporciona una guía para la interpretación de los resultados. Se recomienda a los usuarios que determinen rangos de referencia para las poblaciones de pacientes atendidas por sus propios laboratorios.

Rango Anti-dsDNA IU/mL	Interpretación Sugerida
<30	Negativo para anticuerpos a dsDNA.
≥30 a 50	Límite para anticuerpos a dsDNA – posible LES u otra enfermedad del tejido conjuntivo. Considerar la realización de otras pruebas para el diagnóstico diferencial, por ejemplo, el análisis anti-Sm DIASTAT®. Se debe realizar una prueba dsDNA de repetición con una muestra posterior.
>50 a 300	Positivo para anticuerpos a dsDNA – probablemente, LES.
>300	Muy positivo para anticuerpos a dsDNA – altamente diagnóstico para LES.

Muestras Asintomáticas

A 192 muestras de suero de donantes asintomáticos, aparentemente sanos, se les realizó un análisis de anticuerpos anti-dsDNA. El límite negativo se definió como el valor promedio más dos desviaciones estándar y se calculó que era 30 IU/mL. 190/192 muestras (99%) fueron negativas para los anticuerpos al dsDNA utilizando este valor.

El rango de referencia asintomático quedó determinado en <30 IU/mL.



Muestras LES

Se obtuvieron 257 muestras de suero de pacientes con LES clínicamente demostrado. De éstas, 142 (55%) dieron positivo en la prueba anti-dsDNA DIASTAT. La distribución de la frecuencia global de los anticuerpos anti-dsDNA en estos pacientes con LES aparece ilustrada a la derecha.

Muestras No-LES

Se realizó un análisis a otras 119 muestras de grupos de enfermedades no LES. En la siguiente tabla se proporciona la distribución de los resultados.

Enfermedad	Negativo 0-30 IU/mL	Ligeramente Positivo 30-50 IU/mL	Positivo 50-300 IU/mL
Artritis Reumatoidea	32	2	1
Polimiositis	22	1	-
Síndrome de Sjögren	25	1	-
Infecciones Virales	27	1	-
Hipergammaglobulinemia	6	1	-

DATOS SOBRE EL RENDIMIENTO

Correlación

A 338 muestras de suero (100 pacientes asintomáticos, 238 pacientes con LES confirmado) se les realizó un análisis paralelo utilizando el kit anti-dsDNA DIASTAT® con un valor límite de 50 IU/mL y otro ELISA con un valor de 80 IU/mL. Se excluyeron los resultados ligeramente positivos, tal como quedaron definidos por ambos análisis.

		DIASTAT®		
		+ve	-ve	Total
ELISA	+ve	93	12	105
	-ve	7	226	233
	Total	100	228	338

Concordancia global = 94%.

Se obtuvo una buena correlación con anti-dsDNA DIASTAT® y tanto con el radioinmunoanálisis Farr como con el análisis por inmunofluorescencia Crithidia luciliae.

Características de la dilución

Se analizaron cuatro diluciones de cuatro muestras de pacientes en tres análisis, utilizando tres lotes de kits. La siguiente tabla muestra los valores promedio y la recuperación con dilución corregida.

Muestra	Dilución	Valor Promedio IU/mL	Porcentaje de Recuperación %
1	A	171	100
	A/2	79,5	93
	A/4	39,8	93
	A/8	19,7	92
2	A	487	100
	A/2	211	87
	A/4	116	96
	A/8	57,6	95
3	A	146	100
	A/2	67,1	92
	A/4	33,3	91
	A/8	18,1	99
4	A	154	100
	A/2	89,1	116
	A/4	44,6	116
	A/8	26,5	137

Imprecisión

1. **Imprecisión en el análisis**, determinada mediante la prueba de tres controles, con replicación de 12.

Control	Valor Promedio IU/mL	%CV
1	22,4	6.0
2	66,9	4.6
3	105	4.5

2. **Imprecisión entre análisis**, determinada mediante la prueba de tres controles en 50 análisis, utilizando cinco operadores y tres lotes de kits.

Control	Valor Promedio IU/mL	%CV
1	22,2	8.7
2	65,3	9.1
3	105	8.1

LIMITACIONES DE USO













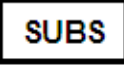
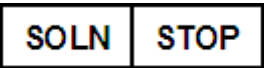
1. Aunque la presencia de títulos elevados de anticuerpos a dsDNA es indicativa de LES, hay que considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Algunas personas pueden presentar niveles elevados de anticuerpos anti-dsDNA con escasas o ninguna evidencia de enfermedad clínica. Por el contrario, algunos pacientes con SLE pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos.
3. Aunque los anticuerpos IgG anti-dsDNA predominan en el LES, también pueden encontrarse anticuerpos IgM anti-dsDNA junto con IgG en algunas muestras. Las muestras que contienen niveles elevados de IgM y niveles bajos de IgG pueden no producir resultados positivos en las pruebas que únicamente miden los anticuerpos IgG¹⁰. Este análisis está configurado para detectar tanto los anticuerpos IgG **como** los anticuerpos IgM anti-dsDNA.
4. Para una repetición de la toma de muestras del paciente, por ejemplo, para monitorización, se debe utilizar el mismo tipo de muestra (suero o plasma) durante todo el período del estudio.

REFERENCIAS

1. Tan EM. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. *Adv Immunol*, **33**, 167-240, 1982,
2. Morrow J, Isenberg D. *Autoimmune Rheumatic Diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
3. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. *Adv Immunol*, **44**, 93-151, 1989.
4. Tan EM, Cohen AS, et al. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheum*, **25**, 1271-1277, 1982.
5. Swaak AJG, Grownwold J, et al. Prognostic Value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis*, **41** 388-395, 1982.
6. Smeenk R, Brinkman K, et al. Antibodies to DNA in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Their Role in the Diagnosis, the Follow-up and the Pathogenesis of the Disease. *Clin Rheum*, **9** (1), 100-110, 1990.
7. Borg EJ, Horst G, et al. Measurement of Increases in anti-dsDNA Antibody Levels as a Predictor of Disease Exacerbation in SLE. *Arth Rheum*, **33**, 634-643, 1990.
8. Halbert SP, Karsh J, Anken M. Studies on Autoantibodies to Deoxyribonucleic Acid and Deoxyribonucleoprotein with Enzyme-Immunoassay (ELISA). *J Lab Clin Med*, **97**, 97-111, 1981.
9. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, et al. The First International Standard for Antibodies to Double Stranded DNA. *Ann Rheum Dis*, **47**, 740-746, 1988.
10. Isenberg DA, Schoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple Serologic Reactions and their Relationship to Clinical Activity in Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren's Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, **27**, 132-138, 1984.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

1. Diluir las muestras y los Controles Positivos y Negativos 1:101. No diluir los Estándares ni el Control de Referencia.
2. Añadir 100µL de Estándares/Control de Referencia por duplicado, muestras y Controles Negativos y Positivos prediluidos, en los vasos referenciados de la banda de microtitulación.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Lavar las bandas 3 veces.
5. Añadir 100µ de IgG/IgM de Conjugado a cada vaso.
6. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
7. Lavar las bandas 3 veces.
8. Añadir 100µL de Substrato a cada vaso.
9. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
10. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada vaso.
11. Leer la absorbencia a 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.
	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning

BUF	WASH	16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag			dsDNA-coated wells and strip holder / Cupules enduites de ADNdb et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA / dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di dsDNA e supporto per strip / dsDNA-klädda brunnar och striphållare
DIL	SPE	5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluyente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL	X		Anti-dsDNA Standards 1-5/ Etalons anti-ADNdb 1-5 / Estandares Anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA Standards 1-5 / Standard anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA-standarder
CONTROL	REF		Anti-dsDNA Reference Control/ Témoïn de référence anti-ADNdb / Control de Referencia Anti-dsDNA / Anti-dsDNA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-dsDNA / Anti-dsDNA referenskontroll
CONTROL	+		Positive Control/ Témoïn positive / Control Positivo / Positiv-Kontrolle / Controllo Positivo / Positiva kontroll
CONTROL	-		Negative Control/ Témoïn negatif / Control Negativo / Negativ-Kontrolle / Controllo negativo / Negativ kontroll

ANWENDUNGSGEBIETE

Der DIASTAT® Anti-dsDNA-Test ist ein quantitativer/qualitativer Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von IgG- und IgM-Autoantikörpern, die für doppelsträngige DNA (dsDNA) in Humanserum oder –Plasma spezifisch sind. Der Test ist zur Unterstützung der Diagnose von systemischem Lupus erythematoses und zur Überwachung der dsDNA-Antikörperspiegel während der Behandlung und Remission bestimmt und ist isoliert betrachtet nicht maßgebend. Die Autoantikörperspiegel stellen jedoch nur einen Parameter in einem sich aus vielen Kriterien zusammensetzenden diagnostischen Prozess dar.

EINLEITUNG

Systemische Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sind Autoimmunerkrankungen, wie z.B. systemischer Lupus erythematoses (SLE), rheumatoide Arthritis und Mischformen der Konnektivitiden. Ein allgemeines Merkmal der systemischen rheumatischen Erkrankungen ist das Vorliegen zirkulierender Antikörper gegen eine Reihe verschiedener zellulärer Antigene. Der Nachweis und die serologische Charakterisierung spezifischer Autoantikörper spielen bei der Differentialdiagnose dieser Erkrankungen^{1,2} eine wichtige Rolle.

Antikörper gegen dsDNA sind hochspezifisch für SLE und sehr häufig bei unbehandelten Patienten mit aktiver Erkrankung nachweisbar³. Das Auftreten von dsDNA-Antikörpern bei SLE ist eines der Kriterien für die Krankheitsklassifikation durch die American Rheumatism Association⁴. Mehrere Prüfer haben eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und Fluktuationen der Antikörperspiegel festgestellt^{5,6} und deshalb wird die Überwachung der dsDNA-Aktivität bei der Behandlung von SLE-Patienten für sinnvoll erachtet⁷.

Für den Nachweis von dsDNA-Autoantikörpern stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, zum Beispiel der Farr Radioimmunoassay und der Crithidia luciliae-Immunofluoreszenzassay. Diese Tests sind mit Nachteilen in bezug auf Komplexität, mangelnde Sensitivität und Reproduzierbarkeit behaftet. ELISAs bieten gegenüber anderen Methoden⁸ Einfachheit, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Objektivität und können anhand des Anti-dsDNA-Standards Wo/80⁹ der World Health Organisation (WHO) standardisiert werden.

TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit einem Präparat aus Kälberthymus beschichtet, das wegen seines hohen dsDNA-Gehalts gewählt wurde. Während der ersten Inkubation binden sich im verdünnten Serum oder Plasma vorliegende spezifische Autoantikörper an die mit Antigen beschichtete Oberfläche. Die Vertiefungen werden dann zur Entfernung ungebundener Komponenten gewaschen. Bei der zweiten Inkubation bindet das Konjugat, enzym-markierte Antikörper gegen humanes IgG und IgM, jeden an die Oberfläche gebundenen Autoantikörper. Nach weiterem Waschen werden spezifische Autoantikörper durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und führt zu einem farbigen Endprodukt. Die Menge des gebundenen Konjugates wird in Extinktionseinheiten gemessen. Im qualitativen Protokoll wird die von der Probe gebundene Konjugatmenge mit der durch die entsprechende Referenzkontrolle gebundenen Konjugatmenge verglichen. Im quantitativen Protokoll kann die Konzentration von Anti-ds DNA Autoantikörper durch Interpolation von einer Dosis-Antwort-Kurve auf der Grundlage von Standards geschätzt werden. Die Standards werden mit dem WHO Referenzpräparat Wo/80 verglichen und in Internationalen Einheiten pro mL (IU/mL) angeben.

TESTKIT-REAGENZIEN

A	IgG/IgM-Konjugat	1 × 15mL	Mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper gegen Human-IgG und IgM, Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1% (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
B	Substrat	1 × 15mL	Mg ²⁺ , Phenolphthaleinmonophosphat (PMP), Pufferlösung. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern.	
C	Stopplösung	1 × 15mL	Natriumhydroxid, EDTA, Carbonatpuffer (pH >10). Gebrauchsfertig.	
D	Waschpuffer-konzentrat (16X)	2 × 25mL	Boratpuffer, 0,4% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
E	dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen	12 × 8 Streifen mit Mikrotiter-vertiefungen	Beschichtet mit dsDNA Antigen in einer wiederverschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel. Farbcodierung: HELLGRÜN . Von jedem Mikrotiterstreifen können einzelne Markierungen abgebrochen werden.	
F	Probendiluens 2-Konzentrat (5X)	1 × 25mL	Phosphatpuffer, Proteinstabilisator, 5% (w/v) Triton X –100, 0,5% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
1-5	Anti-dsDNA-Standards	5 × 1,0mL	Humanplasma, Puffer, <0,1% (w/v) Natriumazid. 0, 10, 50, 150, 300 IU/mL. Gebrauchsfertig.	
6	Anti-dsDNA – Referenzkontrolle	1 × 1,5mL	Humanplasma, Puffer, <0,1% (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
+/-	Positive Kontrolle Negative Kontrolle	1 × 0,2mL 1 × 0,1mL	Humanplasma, <0,1% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch mit Probendiluens 2 im Verhältnis 1:101 verdünnen, wie die Proben.	
	Packungsbeilage			

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Haltbarkeit des geöffneten Testkits

Ein Testkit wurde geöffnet und während einer dreimonatigen Periode dreimalig ohne nachteilige Wirkung auf die Kitleistung wieder verwendet.

Handhabungs- und Verfahrenshinweise

1. Die Testkit-Bestandteile bei 2-8° C lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum verwenden. Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus verwenden.
2. Reagenzien aus verschiedenen Testkit-Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden.
3. Testkits nicht einfrieren.
4. Waschpuffer-Konzentrat, Probendiluens 2-Konzentrat und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünntes Probendiluens 2 sind bei 2-8° C bis zu 6 Monaten beständig, wenn eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
6. Überzählige Mikrotiterstreifen in die Folienpackung zurückgeben mit dem Trockenmittel bis zum Gebrauch bei 2-8° C lagern.
7. Das Plattengestell ist nur zum Gebrauch mit einschnappbaren Vertiefungen geeignet.
8. Das Substrat während der Lagerung nicht der Lichteinwirkung aussetzen.
9. Die Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

Anzeichen einer Wertminderung

Das Substrat soll hellgelb aussehen. Eine Rosafärbung ist ein Anzeichen für eine Kontamination, und das Reagenz muss verworfen werden. Trübung oder Niederschlag in einem Bestandteil sind Anzeichen einer Wertminderung, und der Bestandteil muss verworfen werden.

ProbensammLung und Aufbewahrung

Dieser Test wird für Serum-/Plasmaproben empfohlen. Lipämische, hämolysierte oder trübe Proben dürfen nicht verwendet werden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen, und erneutes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Proben nicht durch Erhitzen inaktivieren, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Die Proben müssen innerhalb von 12 Stunden nach der Entnahme getestet werden oder können bei oder unter -20° C gelagert werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**Nur für die Anwendung als in-vitro Diagnostikum.****Vorsichtsmaßnahmen**

1. Die Anleitungen in dieser Broschüre, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, strikt befolgen.
2. Standards und Kontrollen enthalten menschliches Plasma und wurden mit FDA-zugelassenen Assays auf Hepatitis-B-Surface-Antigen, HCV, HIV-Antigen und HIV-Antikörper getestet und als nicht reaktiv/negativ befunden. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen alle Standards und Kontrollen als potentiell infektiös angesehen und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien wie andere potentiell gefährliche biologische Materialien behandelt werden. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3. Auflage, 1993, beschreibt wie diese Materialien unter Beachtung der Good Laboratory Practice (GLP) zu handhaben sind. Dies trifft in den USA zu.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
5. Alle erkrankten Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und weitere Hautläsionen ausreichend schützen.
6. Standards, Kontrollen, Konjugat, Probendiluens 2-Konzentrat und Waschpuffer-Konzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohren unter Bildung hoch explosiver Metallazide reagieren kann. Zur Vermeidung einer AzidansammLung bei der Entsorgung mit reichlich Wasser wegspülen.
7. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Natriumhydroxid muss mit reichlich Wasser aufgewischt werden. Wenn Berührung mit Augen oder Haut auftritt, mit Wasser abspülen und sofort den Arzt konsultieren.
8. Das Substrat enthält PMP, Bronidox L und Dietanolamin. Kontakt mit Haut, Augen und Atemwege vermeiden. Bei Kontakt mit Haut, Augen oder Atemwege mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
9. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage von Svar Life Science erhältlich.



B.

SUBS

Achtung

Enthält: Dietanolamin

- H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



C.

SOLN	STOP
------	------

Achtung

Enthält: Natriumhydroxid

- H315: Verursacht Hautreizungen.
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P302+P352: BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P332+P313: Im Falle einer Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Achtung

Enthält: Natriumazid

- H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
 EUH032: Kontakt mit Säure setzt sehr giftige Gase frei.
 H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit lang anhaltender Wirkung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
 P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

VORBEREITUNG

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien/Geräte

1. Lesegerät mit 550 nm Filter (540-565 nm ist zulässig) für eine Platte/einen Streifen mit 96 Vertiefungen.
2. Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 µL, 100 µL und 1mL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 100 µL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 200 µL zum manuellen Waschen, wahlweise mit einem automatischen Plattenwäscher.
3. Glas-/Kunststoffmesszylinder: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Gefäße zur Aufnahme eines 1mL Volumens
5. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
6. Papiertücher.
7. Stoppuhr für 30 und 60 Minuten Intervalle.

Vorbereitung zur Testdurchführung

Alle Testkit-Bestandteile, einschließlich der Mikrotiterstreifen, vor Gebrauch 30-60 Minuten auf bis zu 18-25° C anwärmen Die Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen.

Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich mischen.

Reagenz	Volumen	Zugabe
Waschpuffer-Konzentrat	1 Flasche	375mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Probendiluens 2-Konzentrat	1 Flasche	100mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Positiv- und Negativ-Kontrollen/Proben	10 µL	1mL verdünntes Probendiluens 2

Mikrotitervertiefungen gibt es in Streifen mit je acht Vertiefungen. Wenn eine andere Einheit als je acht Vertiefungen benötigt wird, wie folgt vorgehen:

1. Den Streifen durch Drücken auf die Unterseite der Vertiefungen aus dem Rahmen nehmen.
2. Die benötigte Zahl von Vertiefungen abbrechen.
3. Das rechteckige Loch in die untere Kante (zu H) der Kerbe im Rahmen einhängen.
4. Sicherstellen, dass das Vierkantloch, mit Einkerbung auf der linken Seite, entlang der oberen Kante sicher festgehalten wird (Reihe A).

TESTPROTOKOLL

Qualitatives Protokoll: Referenzkontrolle, Positiv- und Negativ-Kontrollen und Proben testen.

Quantitatives Protokoll: Standards (1-5), Positive und Negative Kontrollen und Proben testen.

1. Referenzvertiefungen zum Nachweis.
2. 100µL Referenzkontrollen/Standards (Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Bitte denken Sie daran, zwischen den Zugaben die Pipettenspitzen zu wechseln. Dieser Schritt darf für die jeweilige Standard-/Kontroll-/Probenreihe nicht länger als 15 Minuten dauern.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umkehren über einem für die Entsorgung biologischer Materialien geeigneten Spülbecken dekantieren, wobei die potentielle Infektionsgefahr der Proben zu berücksichtigen ist. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
5. Die Vertiefungen **dreimal** mit mindestens 200µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Dekantieren und nach jedem Waschschrift abtupfen.
6. In jede Vertiefung 100 µL IgG/IgM Konjugat geben.
7. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
8. Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. In jede Vertiefung 100 µL Substrat geben.
10. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren. **Nicht dekantieren.**
11. In der gleichen Reihenfolge und Rate wie für das Substrat in jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben. Die Vertiefungen durch vorsichtiges Beklopfen mischen.

12. Die Streifen innerhalb von 24 Stunden bei 550 nm (540-565 nm) ablesen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test getrennt auswerten.

Qualitatives Protokoll

Das Verhältnis des Extinktionswertes (optische Dichte) für die Positiv- und Negativ-Kontrollen und für jede Probe berechnen.

$$\text{Extinktionsverhältnis} = \frac{\text{Extinktionswert der Probe oder Kontrolle}}{\text{Mittelwert der Extinktion der Referenzkontrolle}}$$

Die Anwender müssen einen für ihre Patientenpopulationen spezifischen Cut-off-Wert zwischen den positiven und negativen Proben berechnen. Die Ergebnisse von den Patientenpopulationen, die an der von Svar Life Science durchgeführten klinischen Prüfung teilnahmen, deuten auf den folgenden Cut-off-Wert hin:

<u>Extinktionsverhältnis</u>	<u>Interpretation der Ergebnisse</u>
<0,95	Negativ
≥0,95 bis ≤1,0	Borderline – Testwiederholung empfohlen
>1,0	Positiv

Quantitatives Protokoll

Der durchschnittliche Extinktionswert jedes Standards wird gegen eine \log_{10} -Standardkonzentration (siehe nachfolgende Tabelle) auf geeignetem Diagrammpapier aufgezeichnet. Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können dann von der Standardkurve abgelesen werden. Zum Vergleich ist unten eine typische Kurve abgebildet, die allerdings nicht für die Interpretation der Ergebnisse verwendet werden darf. 4 Parameter umfassende angepaßte logistische (4PL) log/logit- oder Spline-Kurven sind ebenfalls ausreichend.

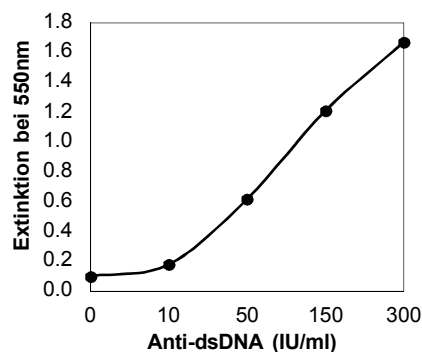
Proben mit Absorbanzen über Standard 5 (300 IU/mL) liegen außerhalb des Assaybereichs und werden als >300 IU/mL angegeben, verdünnt und nochmals getestet und um diesen weiteren Verdünnungsfaktor berichtigt.

Bitte beachten: Wie jeder Assay zum Nachweis von Antikörpern bestimmt auch dieser Assay die Aktivität der in der Probe vorkommenden Antikörper und nicht die Konzentration. Die Aktivität kann von einer Reihe verschiedener Parameter beeinflusst werden, wie zum Beispiel der Antikörper-Avidität.

Standardkonzentrationen

Standard-nummer	Konzentration IU/mL
1	0
2	10
3	50
4	150
5	300

Typische Standardkurve



QUALITÄTSKONTROLLE

Darauf achten, dass eine angemessene Instandhaltung und Kalibrierung des Plattenlesegerätes nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die richtige Wellenlänge angewendet wird.

Die Laboratorien sollten sicherstellen, dass das Personal mit der Testanleitung, besonders aber den Abschnitten zu den Warnungs- und Vorsichtsmaßnahmen sowie den Handhabungs- und Verfahrenshinweisen vollkommen vertraut ist. Das Personal muss darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass es vor der Herausgabe der Patientenergebnisse Leistungsspezifikationen in Bezug auf die Präzision und den zu berichtenden Bereich der Testergebnisse erheben kann, die mit den von dem Hersteller vorgegebenen vergleichbar sind. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens wird empfohlen, dass die vorverdünnten Positiv- und Negativkontrollen in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen. Bei allen qualitativen Tests muss die gebrauchsfertige Referenzkontrolle als Doppelbestimmung mitlaufen.

Vorausgesetzt, dass die vom Hersteller beschriebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt werden, ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht herausgegeben werden, wenn eine Kontrolle nicht den unten angegebenen Kontrollverhältnis-Spezifikationen entspricht. Der Test kann nach Überprüfung des Verfahrens oder Kontaktaufnahme mit dem Händler/Hersteller wiederholt werden. Bei Wiederholung des Tests eine frische Verdünnung von jeder Kontrolle und der Probe herstellen. Einige Laboratorien möchten bei jedem Testdurchlauf gegebenenfalls auch ihre laboreigenen Kontrollen mitlaufen lassen. Dieses Kontrollmaterial muss bei oder unter -20°C aufbewahrt werden, wobei wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden sind. Die Ergebnisse der Proben werden durch Konservierungsmittel, wie zum Beispiel Natriumazid (0,1% (w/v)) nicht beeinflusst.

Bei den Konzentrationen von Analyten, die bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden, handelt es sich um diejenigen, die von dem Hersteller für spezifische Populationen vorgegeben werden und stimmen nicht unbedingt mit den in der Literatur angegeben überein. Inzidenz-Grade, ihr Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen, Referenzbereiche und geeignete Cut-off-Punkte sind von dem jeweiligen Laboratorium für die von ihnen betreuten spezifischen Populationen zu berechnen.

Kontrollverhältnis-Spezifikationen

Protokoll	Spezifikationen
Qualitativ (Verhältnisse)	$\frac{\text{Extinktion für die Positive Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$ Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle
	$\frac{\text{Extinktion für die Negativ Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$ <0,95
Quantitativ	Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle für den akzeptierten erwarteten Bereich (IU/mL)
	Konzentration der Negativ-Kontrolle <30 IU/mL

ERWARTETE WERTE

Das Folgende ist eine Richtschnur für die Interpretation der Ergebnisse. Den Anwendern wird empfohlen, Referenzbereiche für die von ihren eigenen Labors betreuten Populationen festzulegen.

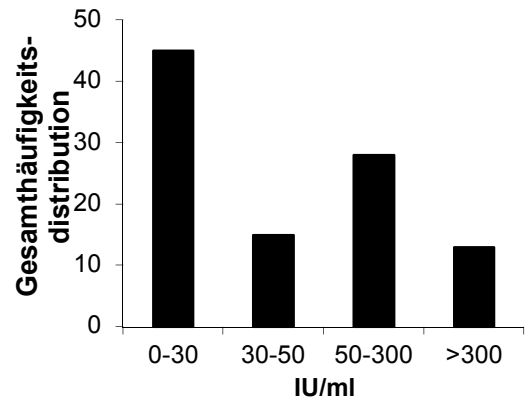
Anti-dsDNA-Bereich IU/mL	Vorgeschlagene Interpretation
<30	Negativ für Antikörper gegen dsDNA.
≥30 bis 50	Borderline für Antikörper gegen dsDNA – möglicher SLE oder eine andere Bindegewebserkrankung. Zur Differentialdiagnose sind andere Tests in Erwägung zu ziehen, z.B. der DIASTAT® Anti-Sm-Assay. Es sollte ein erneuter dsDNA-Test an einer späteren Proben durchgeführt werden.
>50 bis 300	Positiv für Antikörper gegen dsDNA – wahrscheinlich SLE.
>300	Stark positiv für Antikörper gegen dsDNA – hochdiagnostisch für SLE.

Asymptomatische Proben

192 Serumproben von asymptomatischen und scheinbar gesunden Spendern werden auf Anti-dsDNA-Antikörper getestet. Der negative Cut-off war definiert als Mittelwert plus zwei Standardabweichungen und wurde als 30 IU/mL berechnet. 190/192 Proben (99%) waren unter Verwendung dieses Wertes negativ für Antikörper gegen dsDNA. Der asymptomatische Referenzbereich wurde als <30 IU/mL festgelegt.

SLE- Proben

257 Serumproben wurden von Patienten mit klinisch nachgewiesenem SLE entnommen. 142 (55%) davon waren nach dem DIASTAT Anti-dsDNA-Test positiv. Die Grafik gegenüber veranschaulicht die Gesamthäufigkeitsdistribution von Anti-dsDNA-Antikörpern bei diesen SLE-Patienten.



Nicht-SLE-Proben

Weitere 119 Proben von Nicht-SLE-Gruppen wurden getestet. Die Verteilung der Ergebnisse ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Erkrankung	Negativ 0-30 IU/mL	Schwach positiv 30-50 IU/mL	Positiv 50-300 IU/mL
Rheumatoide Arthritis	32	2	1
Polymyositis	22	1	-
Sjögren-Syndrom	25	1	-
Virusinfektionen	27	1	-
Hypergammaglobulinämie	6	1	-

LEISTUNGSMERKMALE

Korrelation

338 Serumproben (100 asymptomatische, 238 bestätigte SLE-Patienten) wurden mit dem DIASTAT® Anti-dsDNA-Kit mit einem Cut-off-Wert von 50 IU/mL und einem anderen ELISA mit einem Wert von 80 IU/mL parallel getestet. Durch beide Tests definierte schwach positive Resultate wurden ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind unten gezeigt.

		DIASTAT®		
		+ve	-ve	Ins-gesamt
ELISA	+ve	93	12	105
	-ve	7	226	233
	Ins-gesamt	100	228	338

Übereinstimmung insgesamt = 94%.

Eine gute Korrelation wurde mit dem DIASTAT® Anti-dsDNA und auch mit dem Farr-Radioimmunoassay sowie mit dem Crithidia luciliae-Immunfluoreszenztest erreicht.

Verdünnungsmerkmale

Vier Verdünnungen von vier Patientenproben wurden in drei Assays mit drei Kitchargen untersucht. In den folgenden Tabellen sind die erhaltenen Mittelwerte und die für die Verdünnung bereinigte Wiederfindung wiedergegeben.

Probe	Verdünnung	Mittelwert IU/mL	Für die Verdünnung bereinigte Wiederfindung (%)
1	A	171	100
	A/2	79,5	93
	A/4	39,8	93
	A/8	19,7	92
2	A	487	100
	A/2	211	87
	A/4	116	96
	A/8	57,6	95
3	A	146	100
	A/2	67,1	92
	A/4	33,3	91
	A/8	18,1	99
4	A	154	100
	A/2	89,1	116
	A/4	44,6	116
	A/8	26,5	137

Impräzision

1. **Intraassay-Impräzision** ermittelt durch Testen von drei Kontrollen. mit Replikation von 12.

Kontrolle	Mittelwert IU/mL	%VK
1	22,4	6,0
2	66,9	4,6
3	105	4,5

2. **Interassay-Impräzision** ermittelt durch Testen von drei Kontrollen in fünfzig Assays mit fünf Bedienern und drei Kitchargen.

Kontrolle	Mittelwert IU/mL	%VK
1	22,2	8,7
2	65,3	9,1
3	105	8,1

ANWENDUNGSGRENZEN













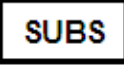
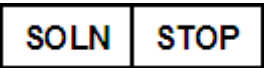
1. Obgleich das Vorliegen hoher Antikörper-Titer gegen dsDNA auf SLE hindeutet, dürfen diese Parameter nur zusammen mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden in Betracht gezogen werden.
2. Bei einigen Patienten können hohe Anti-dsDNA Antikörperspiegel mit wenig oder keinen Hinweisen auf eine klinische Erkrankung vorliegen. Andererseits können bei einigen Patienten mit SLE nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper vorhanden sein.
3. Während IgG Anti-dsDNA-Antikörper bei SLE dominieren, können in manchen Proben auch IgM Anti-dsDNA-Antikörper in Verbindung mit IgG angetroffen werden. Proben, die hohe Spiegel von IgM und niedrige Spiegel von IgG enthalten, liefern vielleicht keine positiven Resultate in Tests, mit denen nur IgG-Antikörper bestimmt werden¹⁰. Dieser Assay ist konfiguriert, um IgG- **und** auch IgM-Anti-dsDNA-Antikörper nachzuweisen.
4. Für eine wiederholte Probengewinnung vom Patienten, wie zum Beispiel zur Überwachung, ist die gesamte Studienperiode über immer der gleiche Probentyp (Serum oder Plasma) zu verwenden.

LITERATUR

1. Tan EM. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. *Adv Immunol*, **33**, 167-240, 1982,
2. Morrow J, Isenberg D. *Autoimmune Rheumatic Diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
3. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. *Adv Immunol*, **44**, 93-151, 1989.
4. Tan EM, Cohen AS, et al. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheum*, **25**, 1271-1277, 1982.
5. Swaak AJG, Grownwold J, et al. Prognostic Value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis*, **41** 388-395, 1982.
6. Smeenk R, Brinkman K, et al. Antibodies to DNA in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Their Role in the Diagnosis, the Follow-up and the Pathogenesis of the Disease. *Clin Rheum*, **9** (1), 100-110, 1990.
7. Borg EJ, Horst G, et al. Measurement of Increases in anti-dsDNA Antibody Levels as a Predictor of Disease Exacerbation in SLE. *Arth Rheum*, **33**, 634-643, 1990.
8. Halbert SP, Karsh J, Anken M. Studies on Autoantibodies to Deoxyribonucleic Acid and Deoxyribonucleoprotein with Enzyme-Immunoassay (ELISA). *J Lab Clin Med*, **97**, 97-111, 1981.
9. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, et al. The First International Standard for Antibodies to Double Stranded DNA. *Ann Rheum Dis*, **47**, 740-746, 1988.
10. Isenberg DA, Schoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple Serologic Reactions and their Relationship to Clinical Activity in Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren's Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, **27**, 132-138, 1984.

ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

1. Die Proben und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen im Verhältnis 1:101 verdünnt werden. Standards und Referenzkontrolle nicht verdünnen.
2. 100µL Referenzkontrolle/Standards (Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und Proben in die entsprechend gekennzeichneten Vertiefungen des Mikrotiterstreifens geben.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Streifen 3-mal waschen.
5. In jede Vertiefung 100 µL IgG/IgM Konjugat geben.
6. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
7. Streifen 3-mal waschen.
8. In jede Vertiefung 100µL Substrat geben.
9. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
10. In jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben.
11. Extinktion bei 550 nm ablesen.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.
	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning

BUF	WASH	16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag			dsDNA-coated wells and strip holder / Cupules enduites de ADNdb et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA / dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di dsDNA e supporto per strip / dsDNA-klädda brunnar och striphållare
DIL	SPE	5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL	X		Anti-dsDNA Standards 1-5/ Etalons anti-ADNdb 1-5 / Estandares Anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA Standards 1-5 / Standard anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA-standarder
CONTROL	REF		Anti-dsDNA Reference Control/ Témoïn de référence anti-ADNdb / Control de Referencia Anti-dsDNA / Anti-dsDNA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-dsDNA / Anti-dsDNA referenskontroll
CONTROL	+		Positive Control/ Témoïn positive / Control Positivo / Positiv-Kontrolle / Controllo Positivo / Positiva kontroll
CONTROL	-		Negative Control/ Témoïn negatif / Control Negativo / Negativ-Kontrolle / Controllo negativo / Negativ kontroll

INDICAZIONI PER L'USO

Il test anti-dsDNA DIASTAT® è un dosaggio immunoenzimatico quantitativo/qualitativo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) per la rivelazione degli autoanticorpi IgG e IgM specifici verso il DNA a doppia catena (dsDNA) nel siero o plasma umano. È indicato quale mezzo adiuvante nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico, nonché per il monitoraggio dei livelli anticorpali dsDNA durante la terapia o la fase di remissione e, da solo, non va considerato come definitivo. I livelli autoanticorpali rappresentano uno dei parametri del processo diagnostico a più criteri.

INTRODUZIONE

Le malattie reumatiche sistemiche sono affezioni autoimmuni, quali lupus eritematoso sistemico (LES), artrite reumatoide e malattia mista del connettivo, generalmente, caratterizzate dalla presenza di anticorpi circolanti verso numerosi antigeni cellulari. La rivelazione e la caratterizzazione sierologica degli autoanticorpi specifici assumono un ruolo essenziale nella diagnosi differenziale di queste patologie^{1,2}.





Gli anticorpi anti-dsDNA sono molto specifici del LES e la loro frequenza è elevata nei pazienti non trattati nella fase attiva della malattia³. La presenza di anticorpi dsDNA nel LES è uno dei criteri adottati dall'American Rheumatism Association per classificare la patologia⁴. Numerosi ricercatori hanno segnalato una correlazione tra l'attività della patologia e le fluttuazioni nei livelli anticorpali⁵⁻⁶, per il qual motivo il monitoraggio dell'attività dei dsDNA è utile nella gestione dei pazienti affetti da LES⁷.

Sono disponibili numerose tecniche per la rivelazione degli autoanticorpi verso il dsDNA, tra cui il dosaggio radioimmunologico di Farr e per immunofluorescenza con *Crithidia lucilliae*; questi test hanno svantaggi inerenti in termini di complessità e mancanza di sensibilità e riproducibilità. Per contro, gli ELISA offrono maggiore semplicità, sensibilità, riproducibilità e obiettività rispetto ad altre metodiche⁸ e possono essere standardizzati rapportandoli allo standard anti-dsDNA Wo/80⁹ dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con un preparato di timo di vitello, selezionato per il suo alto contenuto in dsDNA. Durante la prima incubazione, gli autoanticorpi specifici nel siero o plasma diluito si legano con la superficie rivestita con antigene; i pozzetti sono quindi lavati per rimuovere i componenti non legati. Nella seconda incubazione, il coniugato - anticorpi, marcati con un enzima, verso l'IgG e l'IgM umana - si lega a qualsiasi autoanticorpo adeso alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, gli autoanticorpi specifici vengono tracciati per incubazione con il substrato. L'aggiunta della soluzione bloccante pone fine alla reazione, generando un prodotto finale colorato. La quantità di coniugato legato viene misurata in unità di assorbanza. Nel protocollo qualitativo, la quantità di coniugato legato dal campione viene rapportata contro quella legata dal controllo di riferimento, mentre in quello quantitativo, la concentrazione degli autoanticorpi anti-dsDNA può essere valutata per interpolazione dalla curva dose-risposta basata sugli standard. Gli standard vengono rapportati contro il preparato di riferimento Wo/80 dell'OMS ed espressi in unità internazionali per mL (IU/mL).

COMPONENTI DEL KIT

A	Coniugato IgG/IgM	1 × 15mL	Anticorpi, marcati con fosfatasi alcalina per l'IgG umana and IgM, tampone Tris, stabilizzante delle proteine, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso.	
B	Substrato	1 × 15mL	Mg ²⁺ , fenolfaleina monofosfato (PMP), soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare evitando l'esposizione alla luce.	
C	Soluzione bloccante	1 × 15mL	Iodossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH >10). Pronta all'uso.	
D	Tampone di lavaggio concentrato (16X)	2 × 25mL	Tampone borato, azide di sodio 0,4% (p/v). Diluire prima dell'uso.	
E	Pozzetti rivestiti con dsDNA e supporto per strip	8 pozzetti di microtitolazione da 12 strip	Rivestiti con l'antigene dsDNA, in confezione di alluminio risigillabile con essiccante. Codice a colori: VERDE LIMONE. I singoli pozzetti possono essere staccati da ciascuna strip di microtitolazione.	
F	Diluyente per campioni 2 concentrato (5X)	1 × 25mL	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine, 0,5% (p/v) Triton X-100, azide di sodio 0,5% (p/v). Diluire prima dell'uso.	
1-5	Standard anti-dsDNA	5 × 1,0mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). 0, 10, 50, 150, 300 IU/mL. Pronto per l'uso.	
6	Controllo di riferimento anti-dsDNA	1 × 1,5mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso.	
+/-	Controllo positivo Controllo negativo	1 × 0,2mL 1 × 0,1mL	Plasma umano, azide di sodio <0,1% (p/v). Diluire 1:101 con il diluyente per campioni diluito 2 prima dell'uso, come per i campioni.	
	Foglio illustrativo			

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Stabilità del kit aperto

Un kit è stato aperto e utilizzato in tre occasioni, in un periodo di tre mesi, con nessun segno di deterioramento prestazionale.

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non miscelare componenti appartenenti a lotti di numero diverso.
3. Non congelare i kit.
4. Prima dell'uso, diluire il tampone di lavaggio concentrato, il diluyente per campioni 2 concentrato e i controlli positivi e negativi. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Una volta diluiti, il tampone di lavaggio e il diluyente per campioni 2 sono stabili a temperature comprese tra 2° C e 8° C per un periodo massimo di 6 mesi, in assenza di contaminazione microbica.
6. Riporre le strip di microtitolazione inutilizzate nella confezione di alluminio, contenente essiccante, e conservare a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino al momento dell'uso.
7. Il supporto della piastra è stato adattato per essere usato solo con i pozzetti staccabili.
8. Conservare il substrato senza esporlo alla luce.
9. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.

Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere di colore giallo pallido. Una colorazione rosa è indice di contaminazione e il reagente va smaltito. La torbidità o la precipitazione di un componente qualsiasi è indice di deterioramento e il componente va smaltito.

Raccolta e conservazione dei campioni

Il dosaggio è indicato per i campioni di siero o plasma; non utilizzare campioni lipemici, emolizzati o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del test; evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Non inattivare mediante calore i campioni, per evitare di ottenere falsi positivi. I campioni possono essere analizzati entro 12 ore dal prelievo, oppure conservati a temperature eguali o inferiori a -20° C.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per solo uso diagnostico in vitro.

Precauzioni di sicurezza

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. Gli standard e i controlli contengono plasma umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'antigene di superficie per il virus dell'epatite B, l'antigene dell'epatite C, l'antigene e gli anticorpi dell'HIV e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, gli standard e i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopercorosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3^a edizione, 1993, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo non è applicabile negli Stati Uniti d'America.
3. Non pipettare con la bocca
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. Gli standard, i controlli, il coniugato, il diluente per campioni 2 concentrato e il tampone di lavaggio concentrato contengono azide di sodio, che reagisce con tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Smaltire negli scarichi unitamente ad abbondanti quantità d'acqua per evitare l'accumulo di azide.
7. La soluzione bloccante contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Eventuali spandimenti vanno mescolati con acqua abbondante e raccolti con materiale assorbente. Se viene a contatto con la pelle o gli occhi, irrigare con acqua e rivolgersi immediatamente al medico.
8. Il substrato contiene PMP, Bronidox L e dietanolamina. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e il sistema respiratorio. In caso di contatto con queste parti risciacquare con acqua e consultare un medico.
9. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Svar Life Science.

B.

SUBS

Attenzione

Contiene: Dietanolamine

H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



C.

SOLN	STOP
------	------

Attenzione

Contiene: Idrossido di sodio

H315:	Provoca irritazione cutanea.
H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P332+P313:	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attenzione

Contiene: Azide di sodio

H302:	Nocivo se ingerito.
EUH032:	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
H412:	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso..
P301+P312:	IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P273:	Non disperdere nell'ambiente.

PREPARAZIONE

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

1. Lettore per piastra da 96 pozzetti/strip con filtro da 550nm (540-565nm è accettabile).
2. Pipette di precisione per dispensare 10µL, 100µL, 1mL. Pipetta automatica per dispensare 100µL. Pipetta automatica per dispensare 200µL per il lavaggio manuale. Lavapietra automatica opzionale.
3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1×100mL, 1×400mL.
4. Contenitore di 1mL di volume.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette assorbenti di carta.
7. Timer per intervalli di 30 e 60 minuti.

Preparazione del dosaggio

Prima dell'uso, lasciar riscaldare i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, fino a temperature comprese tra 18° C e 25° C per 30-60 minuti. Miscelare delicatamente i reagenti per inversione.

Non diluire il controllo di riferimento.

Diluire i seguenti reagenti e miscelare accuratamente.

Reagente	Volume	Aggiungere
Tampone di lavaggio concentrato	1 flaconcino	375mL di acqua distillata/deionizzata.
Diluente per campioni 2 concentrato	1 flaconcino	100mL di acqua distillata/deionizzata.
Controlli positivi e negativi/campioni	10µL	1mL di diluente per campioni 2 diluito

I pozzetti di microtitolazione sono forniti in strip di otto. Nel caso in cui fossero necessari pozzetti in numero superiore a multipli di otto, eseguire quanto segue:

1. Rimuovere la strip dal supporto spingendo sulla parte inferiore dei pozzetti.
2. Staccare il numero di pozzetti voluto.
3. Inserire il foro rettangolare nel bordo inferiore (H) della scanalatura del supporto.
4. Verificare che il foro quadrato, con la tacca alla sinistra, sia posizionato saldamente lungo il bordo superiore (riga A).

PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO

Protocollo qualitativo: analizzare il controllo di riferimento, i controlli positivo e negativo e i campioni.

Protocollo quantitativo: analizzare gli standard (1-5), i controlli positivo e negativo e i campioni.

1. Marcare i pozzetti per l'identificazione.
2. Dispensare con la pipetta 100µL di controllo di riferimento/standard in duplicato, i controlli positivo e negativo prediluiti e i campioni prediluiti dei pazienti negli appositi pozzetti. Ricordarsi di cambiare il puntale della pipetta ad ogni aggiunta di volumi. Questa operazione non deve richiedere più di 15 minuti per un ogni serie di standard/controlli/campioni.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Decantare il contenuto delle strip per inversione rapida in un lavello idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale infettivo dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta assorbente.
5. Lavare i pozzetti tre volte con almeno 200µL di tampone di lavaggio diluito. Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.
6. Aggiungere 100µL di coniugato IgG/IgM in ciascun pozzetto.
7. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità del substrato. Picchiettare delicatamente i pozzetti per miscelare.
12. Leggere le strip entro 24 ore a 550nm (540-565nm).

CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Valutare ciascun saggio separatamente per calcolare e interpretare i risultati.

Protocollo qualitativo

Calcolare il rapporto del valore di assorbanza (densità ottica) per i controlli positivi e negativi e per ciascun campione.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{valore d'assorbanza del campione o controllo}}{\text{valore medio d'assorbanza del controllo di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare il valore di normalità (punto di cut-off) tra campioni positivi e negativi, che sia specifico alla loro popolazione di pazienti. I risultati ottenuti dalle popolazioni di pazienti, adottate negli studi clinici condotti da Svar Life Science, suggeriscono i seguenti valori di normalità:

<u>Rapporto di assorbanza</u>	<u>Interpretazione dei risultati</u>
<0,95	Negativo
≥da 0,95 a ≤1,0	Valore borderline: si consiglia di ripetere il test
>1,0	Positivo

Protocollo quantitativo

Mettere in grafico il valore medio d'assorbanza per ciascuno standard contro la concentrazione standard \log_{10} (vedere la tabella che segue) su carta grafica appropriata. Leggere la concentrazione dei controlli e dei campioni sulla curva standard; un grafico tipico è riportato di seguito a scopo di riferimento e non va pertanto utilizzato per l'interpretazione dei risultati. È pure accettabile la curva logistica a 4 parametri (4PL), logit-log o spline.

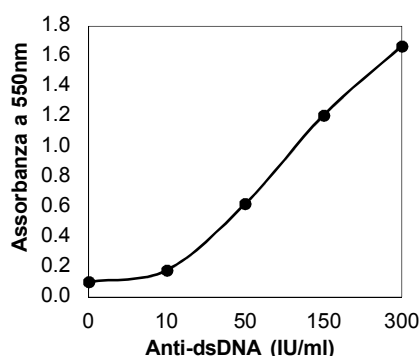
I campioni con assorbanza superiore allo standard 5 (300 IU/mL) sono fuori intervallo di dosaggio e vanno riportati come >300 IU/mL, diluiti e rianalizzati, correggendo il fattore di diluizione.

NOTA: analogamente a qualsiasi metodo di misura degli anticorpi, questo dosaggio determina l'attività degli anticorpi presenti nel campione, non la loro concentrazione. L'attività può essere influenzata da diversi parametri, come l'avidità degli anticorpi.

Concentrazioni standard

Numero standard	Concentrazione IU/mL
1	0
2	10
3	50
4	150
5	300

Curva standard tipica



CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Verificare che la manutenzione e calibrazione del lettore di piastre vengano eseguite in modo adeguato e in conformità alle istruzioni del costruttore, e che venga impiegata la lunghezza d'onda corretta.

Gli operatori devono accertarsi di aver compreso appieno le istruzioni per il dosaggio, in particolare per quanto concerne le avvertenze, le precauzioni e le annotazioni sulla manipolazione e la procedura.

Inoltre, prima di riferire i risultati dei test al paziente, gli operatori devono aver dimostrato di essere in grado di ottenere specifiche prestazionali, in termini di precisione e di intervallo riportabile dei risultati, equiparabili a quelle stabilite dal costruttore.

Si consiglia di effettuare i controlli positivo e negativo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi, al fine di monitorare la qualità della procedura. Eseguire il controllo di riferimento, pronto per l'uso, in duplicato per tutti i dosaggi qualitativi.

Presupponendo che le specifiche di precisione descritte dal costruttore siano soddisfatte, qualora un controllo qualsiasi non soddisfi le specifiche del rapporto di controllo riportate di seguito, il dosaggio va considerato non valido e non va riportato. L'operatore può ripetere il dosaggio, dopo aver riesaminato la tecnica operativa seguita, oppure rivolgersi al distributore o costruttore. Se il dosaggio viene ripetuto, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. Per ciascuna serie analitica, i laboratori possono scegliere di includere i propri controlli interni. Conservare i materiali di controllo a temperature pari o inferiori a -20° C; evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. I preservanti, come l'azide di sodio a 0,1% (p/v), non incidono in alcuna misura sui risultati dei campioni.

I livelli degli analiti identificati in patologie specifiche sono quelli stabiliti dal costruttore per popolazioni specifiche, per il qual motivo è possibile che non riflettano quanto riportato nella letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, gli intervalli di riferimento e i valori di normalità appropriati devono essere calcolati per le popolazioni specifiche servite dagli operatori.

Specifiche del rapporto di controllo

Protocollo	Specifiche
Qualitativo (rapporti)	$\frac{\text{Assorbanza controllo positivo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}}$ vedere l'etichetta del controllo positivo
	$\frac{\text{Assorbanza controllo negativo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}}$ <0,95
Quantitativo	Vedere l'etichetta del controllo positivo per l'intervallo accettabile previsto (IU/mL).
	Concentrazione controllo negativo <30 IU/mL

VALORI ATTESI

Quanto segue viene riportato esclusivamente come guida all'interpretazione dei risultati; si consiglia che gli operatori stabiliscano gli intervalli di riferimento per le popolazioni servite dal laboratorio.

Intervallo anti-dsDNA (IU/mL)	Interpretazione suggerita
<30	Negativo per gli anticorpi verso il dsDNA.
≥da 30 a 50	Borderline per gli anticorpi verso il dsDNA: probabilità di LES o altre malattie del connettivo. Vanno presi in considerazione ulteriori test per la diagnosi differenziata, ad es. il test anti-Sm DIASTAT®. Ripetere il test dsDNA su un altro campione.
>da 50 a 300	Positivo per gli anticorpi verso il dsDNA: LES probabile.
>300	Molto positivo per gli anticorpi verso il dsDNA: indice diagnostico elevato di LES.

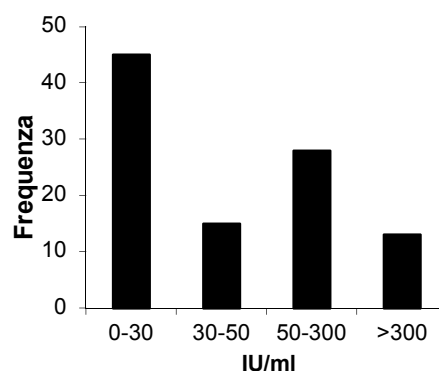
Campioni asintomatici

192 campioni sierici, prelevati da donatori asintomatici, apparentemente sani, sono stati analizzati per gli anticorpi anti-dsDNA. Il valore di soglia (cut-off) negativo è stato definito come il valore medio più due deviazioni standard e calcolato eguale a 30 IU/mL. Adottando questo valore, 190 dei 192 campioni (99%) erano negativi per gli anticorpi verso il dsDNA.

È stato stabilito l'intervallo di riferimento asintomatico di <30 IU/mL.

Campioni LES

Sono stati prelevati 257 campioni sierici da pazienti con diagnosi di LES clinicamente confermata. Di questi, 142 (55%) erano positivi utilizzando il test anti-dsDNA DIASTAT. La frequenza di distribuzione totale degli anticorpi anti-dsDNA in questi pazienti è riportata a fianco.

**Campioni non LES**

Sono stati analizzati ulteriori 119 campioni dei gruppi di malattia non LES. La distribuzione dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Malattia	Negativo 0-30 IU/mL	Debole-positivo 30-50 IU/mL	Positivo 50-300 IU/mL
Artrite reumatoide	32	2	1
Polimiosite	22	1	-
Sindrome di Sjögren	25	1	-
Infezioni virali	27	1	-
Ipergammaglobulinemia	6	1	-

DATI SULLE PRESTAZIONI**Correlazione**

338 campioni sierici (100 asintomatici, 238 LES confermato) sono stati analizzati in parallelo con il kit anti-dsDNA DIASTAT® con un valore di soglia (cut-off) di 50 IU/mL e con un altro ELISA con un valore di 80 IU/mL. Sono stati esclusi i deboli-positivi, come definiti da entrambi i test. I risultati sono riportati di seguito.

		DIASTAT		Totale
		+ve	-ve	
ELISA	+ve	93	12	105
	-ve	7	226	233
	Totale	100	228	338

Concordanza totale = 94%.

Si è ottenuta una buona correlazione con il test anti-dsDNA DIASTAT® ed entrambi i test RIA di Farr e FIA con *Crithidia lucilliae*.

Caratteristiche di diluizione

Sono state analizzate quattro diluizioni dei campioni di quattro pazienti in tre dosaggi, utilizzando tre lotti di kit. Nella tabella che segue sono riportati i valori medi ottenuti e la percentuale di recupero.

Campione	Diluizione	Valore medio IU/mL	% di recupero
1	A	171	100
	A/2	79,5	93
	A/4	39,8	93
	A/8	19,7	92
2	A	487	100
	A/2	211	87
	A/4	116	96
	A/8	57,6	95
3	A	146	100
	A/2	67,1	92
	A/4	33,3	91
	A/8	18,1	99
4	A	154	100
	A/2	89,1	116
	A/4	44,6	116
	A/8	26,5	137

Imprecisione

1. **Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando tre controlli, con 12 repliche.

Controllo	Valore medio IU/mL	%CV
1	22,4	6,0
2	66,9	4,6
3	105	4,5

2. **Imprecisione interdosaggio** determinata analizzando tre controlli in 50 dosaggi, utilizzando cinque operatori e tre lotti di kit.

Controllo	Valore medio IU/mL	%CV
1	22,2	8,7
2	65,3	9,1
3	105	8,1

LIMITI D'IMPIEGO













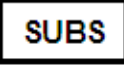
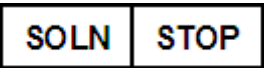
1. Sebbene la presenza di titoli elevati di anticorpi verso il dsDNA sia indice di LES, i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. In alcuni soggetti possono essere presenti elevati livelli di anticorpi anti-dsDNA con scarsa o nessuna evidenza della patologia clinica. Per contro, in alcuni pazienti affetti da LES, i livelli di questi anticorpi possono essere non rivelabili.
3. Sebbene gli anticorpi IgG anti-dsDNA predominino nel LES, in alcuni campioni possono essere osservati, assieme agli IgG, anche gli anticorpi IgM anti-dsDNA. I campioni contenenti livelli elevati di IgM e bassi livelli di IgG possono dare risultati positivi nei test che misurano solo gli anticorpi IgG¹⁰. Questo test può essere configurato in modo da rivelare gli anticorpi IgG e IgM anti-dsDNA.
4. Nel caso di analisi ripetute sui campioni dei pazienti, ad es. per monitoraggio, utilizzare lo stesso tipo di campione (siero o plasma) per l'intera durata del periodo di studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. *Adv Immunol*, **33**, 167-240, 1982,
2. Morrow J, Isenberg D. *Autoimmune Rheumatic Diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
3. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. *Adv Immunol*, **44**, 93-151, 1989.
4. Tan EM, Cohen AS, et al. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheum*, **25**, 1271-1277, 1982.
5. Swaak AJG, Grownwold J, et al. Prognostic Value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis*, **41** 388-395, 1982.
6. Smeenk R, Brinkman K, et al. Antibodies to DNA in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Their Role in the Diagnosis, the Follow-up and the Pathogenesis of the Disease. *Clin Rheum*, **9** (1), 100-110, 1990.
7. Borg EJ, Horst G, et al. Measurement of Increases in anti-dsDNA Antibody Levels as a Predictor of Disease Exacerbation in SLE. *Arth Rheum*, **33**, 634-643, 1990.
8. Halbert SP, Karsh J, Anken M. Studies on Autoantibodies to Deoxyribonucleic Acid and Deoxyribonucleoprotein with Enzyme-Immunoassay (ELISA). *J Lab Clin Med*, **97**, 97-111, 1981.
9. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, et al. The First International Standard for Antibodies to Double Stranded DNA. *Ann Rheum Dis*, **47**, 740-746, 1988.
10. Isenberg DA, Schoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple Serologic Reactions and their Relationship to Clinical Activity in Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren's Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, **27**, 132-138, 1984.

RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

1. Diluire 1:101 i campioni e i controlli positivo e negativo. Non diluire gli standard o il controllo di riferimento.
2. Aggiungere 100µL di controllo di riferimento/standard in duplicato, i controlli positivo e negativo e i campioni prediluiti nei pozzetti identificati della strip di microtitolazione.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Lavare le strip 3 volte.
5. Aggiungere 100µL di coniugato IgG/IgM in ciascun pozzetto.
6. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
7. Lavare le strip 3 volte.
8. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
9. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
10. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
11. Leggere l'assorbanza a 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.
	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning

BUF	WASH	16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag			dsDNA-coated wells and strip holder / Cupules enduites de ADNdb et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA / dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di dsDNA e supporto per strip / dsDNA-klädda brunnar och striphållare
DIL	SPE	5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL	X		Anti-dsDNA Standards 1-5/ Etalons anti-ADNdb 1-5 / Estandares Anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA Standards 1-5 / Standard anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA-standarder
CONTROL	REF		Anti-dsDNA Reference Control/ Témoins de référence anti-ADNdb / Control de Referencia Anti-dsDNA / Anti-dsDNA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-dsDNA / Anti-dsDNA referenskontroll
CONTROL	+		Positive Control/ Témoins positive / Control Positivo / Positiv-Kontrolle / Controllo Positivo / Positiva kontroll
CONTROL	-		Negative Control/ Témoins negatif / Control Negativo / Negativ-Kontrolle / Controllo negativo / Negativ kontroll

AVSEDD ANVÄNDNING

DIASTAT® testkit anti-dsDNA är ett kit för kvantitativ/kvalitativ enzymkopplad immunosorbentanalys (ELISA) för detektion av IgG- och IgM-autoantikroppar specifika för dubbelsträngat DNA (dsDNA) i humant serum eller plasma. Testet är avsett som hjälp vid diagnos av systemisk lupus erythematosus (SLE). Det kan också användas för att övervaka nivåer av anti-dsDNA-antikroppar i enskilda patienter under sjukdomens behandling och remission. Testet kan inte användas som ensamt diagnostiskt hjälpmedel. Mängden autoantikroppar är bara en parameter i en diagnostisk process baserad på ett antal kriterier.

INLEDNING

Ett allmänt kännetecken på systemiska reumatiska sjukdomar är närvaron av cirkulerande antikroppar mot en mängd cellulära antigener. Detekteringen av dessa autoantikroppar spelar en nyckelroll i differentialdiagnosen av autoimmuna sjukdomar som systemisk lupus erythematosus (SLE), reumatoid artrit (RA) och mixed connective tissue disease (MCTD) (1,2). Antikroppar mot dsDNA är högst specifika för SLE och detekteras vid hög frekvens i obehandlade patienter med aktiv sjukdom (3). Närvaron av antikroppar mot dsDNA i SLE har inkluderats som ett av kriterierna för sjukdomsklassifikation av American Rheumatism Association (4). Dessutom har ett flertal forskare redogjort för en korrelation mellan sjukdomsaktivitet och fluktuationer i antikropps nivåer (5,6). Följaktligen anses övervakning av dsDNAaktivitet vara användbar vid behandling av SLE-patienter (7).

Ett antal tekniker används för att detektera, såsom Farr radioimmunoassay och Crithidia luciliae immunofluorescence assay. Dessa tester har nackdelar i komplexiteten, låg känslighet och reproducerbarhet.





ELISA-analyser erbjuder däremot enkelhet, känslighet, reproducerbarhet och objektivitet jämfört med andra metoder. Dessutom kan dessa analyser standardiseras genom hänvisning till världshälsoorganisationens (WHO) anti-dsDNA-standard, Wo/80 (9).

ANALYSPRINCIP

Brunnarna i mikrotiterstripsen är belagda med ett preparat av kalvthymus-DNA. Under den första inkubationen binder sig specifika autoantikroppar i utspätt serum eller plasma till antigenbeläggningen. Mikrobrunnarna tvättas sedan för att avlägsna obundna serum- eller obundna plasmakomponenter. Ett konjugat av enzymmärkta antikroppar mot human-IgG och -IgM binder sig till ytbundna antikroppar i den andra inkubationen. Efter ytterligare ett tvättsteg spåras specifika antikroppar genom inkubation med substratlösning. Tillsats av stopplösningen avslutar reaktionen och resulterar i en färgad slutprodukt. Mängden av bundet konjugat mäts uttryckt i absorbansenheter. I det kvalitativa protokollet jämförs mängden konjugat som bundits i närvaro av det okända provet med det som bundits i närvaro av en känd koncentration anti-dsDNA-antikroppar i referenskontrollen.

I det kvantitativa protokollet bestäms koncentrationen av anti-dsDNAantikroppar i ett okänt prov genom interpolation från en responskurva baserad på standarder som kalibrerats mot WHO referenspreparat Wo/80. Resultat redogörs för som internationella enheter (IE) per milliliter.

KOMPONENTER I TESTKITET

A	IgG-/IgM-konjugat	1 x 15 mL	Antikroppar mot humant IgG/IgM, som är konjugerade med alkaliskt fosfat, tris-buffert, proteinstabilisator, <0,1% (m/v) natriumazid. Klar att använda.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , fenoltaleinmonofosfat (PMP), buffert. Klar att använda. Förvaras mörkt.	
C	Stopplösning	1 x 15 mL	Natriumhydroxid, EDTA, karbonatbuffert (pH >10). Klar att använda.	
D	Koncentrerad (16x) tvättbuffert	2 x 25 mL	Boratbuffert, 0,4% (m/v) natriumazid. Spädes före användning.	
E	dsDNA-belagda brunnar samt striphållare	Plattor med 12x8 mikrotiter-brunnar	Belagda med dsDNA-antigen, förpackade i återförslutbar folieförpackning tillsammans med torkmedel. Färgkodade LIMEGRÖN. Enskilda brunnar kan brytas loss från mikrotiterstripet.	
F	Koncentrerad spädvätska 2(5x)	1 x 25 mL	Fosfatbuffert, proteinstabilisator, 5% (v/v) Triton X-100, 0,5% (m/v) natriumazid. Spädes före användning.	
1-5	Anti-dsDNA-standarder	5 x 1,0 mL	Human plasma, buffert, <0,1% (m/v) natriumazid. 0, 10, 50, 150, 300 E/mL. Klar att använda.	
6	Anti-dsDNA referenskontroll	1 x 1,5 mL	Human plasma, buffert, <0,1% (m/v) natriumazid. Klar att använda.	
+/-	Positiv kontroll Negativ kontroll	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Human plasma, <0,1% (m/v) natriumazid. Spädes 1:101 med utspädd spädvätska 2 före användning, på samma sätt som patientproven.	
	Bruksanvisning			

FÖRVARING

Hållbarhet efter öppnandet

Ett kit öppnades och återvändes vid tre tillfällen under en tremånadersperiod utan försämring av egenskaperna.

Hantering och förfarande

1. Lagra komponenterna vid 2–8° C. Använd inte någon komponent efter det utgångsdatum som anges på etiketten.
2. Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
3. Frys inte komponenterna.
4. Glöm inte att späda koncentrerad tvättbuffert, spädvätska 2 och positiva och negativa kontroller före användning. De övriga komponenterna är klara att använda.
5. Tvättbuffert och spädvätska 2 för prov är stabila efter utspädning under upp till 6 månader, om de förvaras vid 2-8° C och inte kontamineras med mikroorganismer.
6. Lägg tillbaka oanvända mikrotiterstrips i folieförpackningen och förvara vid 2-8° C tillsammans med torkmedlet, tills produkten skall användas på nytt.
7. Platthållaren är utformad för plattor med lossbrytbara brunnar.
8. Utsätt ej substratet för ljus under förvaring.
9. Undvik att kontaminera reagensen. Använd en ny engångspipett för varje pipettering av reagens respektive prov.

Tecken på försämrade egenskaper

Substratet skall ha blekgul färg. Om färgen är skär har substratet kontaminerats och måste kasseras. Grumlighet eller fällning i någon komponent innebär att komponenten inte längre är i fullgott skick och måste kasseras.

Provtagning och provförvaring

Analysen är avsedd för serum-/plasmaprov; använd inte prov som är lipemiska, hemolyserade eller grumliga. Blanda upptinade prov omsorgsfullt före analysen, och undvik upprepad frysning/ting. Värmeinaktivera inte proven, eftersom detta kan orsaka falskt positiva svar. Proven bör analyseras inom 12 timmar efter provtagningen eller förvaras vid -20° C.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSMÅTT**Avsett endast för in vitro diagnostik.****Försiktighetsmått**

1. Följ anvisningarna i den här texten noggrant, särskilt i fråga om hantering och lagring.
2. Standarder och kontroller innehåller human plasma som testats med FDA-godkända metoder för analys av hepatit B-antigen, HCV-, HIV-1- och HIV-2-antikroppar, och som därvid befunnits negativa. Eftersom det inte finns någon känd testmetod som garanterar att inga infektiösa agens förekommer bör standarder och kontroller behandlas som potentiellt infektiösa, och hanteras med samma försiktighet som annat potentiellt farligt material. I manualen från CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3e upplagan 1993, beskrivs hur sådana material bör hanteras enligt god laboratoriesed. Denna gäller i USA.
3. Pipettera inte med munnen.
4. I områden där kitet eller proven hanteras får ingen rökning, förtäring eller sminkning förekomma.
5. Alla hudskador som skärsår, skrubbsår osv skall skyddas på lämpligt sätt.
6. I standarderna, kontrollerna, konjugatlösningen, spädvätskan 2 och tvättbufferten ingår natriumazid, som kan reagera med bly och koppar och därvid ge upphov till explosiva metallazider. När vätskorna spolats ut i vask skall de spädas med stora mängder vatten för att förhindra att azider ansamlas.
7. Stopplösningen innehåller natriumhydroxid. Undvik kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Spill bör samlas upp med stora mängder vatten. Om vätskan kommer i kontakt med huden eller ögonen sköljs den exponerade ytan med vatten och kontakt tas med läkare omedelbart.
8. Substratet innehåller PMP, Bronidox L och dietanolamin. Undvik kontakt med hud, ögon och andningsorgan. Om kontakt med hud, ögon eller andningsorgan, skölj med vatten och sök medicinsk hjälp.
9. På begäran kan Svar Life Science tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.

**Varning****B.**

SUBS

Innehåller: Dietanolamin

H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

**Varning****C.**

SOLN	STOP
------	------

Innehåller: Natriumhydroxid

H315:	Irriterar huden.
H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352:	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P332+P313:	Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

**Varning****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Innehåller: Natriumazid

H302:	Skadligt vid förtäring.
EUH032:	Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
H412:	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P301+P312:	VID FÖRTÄRING: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår dåligt.
P273:	Undvik utsläpp till miljön.

FÖRBEREDELSE

Material/utrustning som behövs men som inte medföljer

1. Avläsare med filter för 550 nm, för avläsning av plattor med 96 provbrunnar (avläsning vid 540-565 nm kan accepteras).
2. Precisionspipetter, engångs, 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatisk pipett för dosering av 100 µL. Automatisk pipett för dosering av 200 µL vid manuell tvättning; automatisk platttvättare kan användas.
3. Mätcylinder av glas/plast: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Behållare med volymen 1 mL.
5. Destillerat/avjoniserat vatten.
6. Pappershanddukar.
7. Timer för intervall om 30 och 60 minuter.

Förberedelser för analysen

Låt alla komponenter i kitet, inklusive mikrotiterstripsen, anta en temperatur på 18 – 25° C, under 30 - 60 minuter före användning. Blanda reagensen genom försiktig vändning upp och ned.

Späd inte referenskontrollen.

Späd följande reagens och blanda omsorgsfullt.

Reagens	Volym	Tillsätt
Koncentrerad tvättbuffert	1 flaska	375 mL destillerat/avjoniserat vatten
Koncentrerad spädvätska 2	1 flaska	100 mL destillerat/avjoniserat vatten
Positiva och negativa kontroller/analysprov	10 µL	1 mL utspädd spädvätska 2

Brunnarna för mikrotitrering tillhandahålls i strips om åtta brunnar. Om något antal än en multipel med åtta skall användas gör man så här:

1. Lossa stripen från hållaren genom att trycka underifrån.
2. Bryt loss det antal brunnar som behövs.
3. Haka fast det rektangulära hålet vid nedkanten (rad H) på hållarens spår.
4. Se till att det kvadratiska hålet, med hacket till vänster, sitter ordentligt fast vid överkanten (rad A).

ANALYSFÖRFARANDE

Kvalitativ analys: använd referenskontroll, positiva och negativa kontroller samt patientprov.

Kvantitativ analys: använd standarder (1-5), positiva och negativa kontroller samt patientprov.

1. Gör ett schema över brunnarna för identifiering.
2. Pipettera 100 µL referenskontroll/standarder i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller samt patientprov i respektive brunnar. Kom ihåg att byta pipettspets mellan pipetteringarna. Detta steg bör inte få ta mer än 15 minuter för varje uppsättning av standarder, kontroller och patientprov.
3. Inkubera under 60±10 minuter vid 18 – 25°C.
4. Dekantera innehållet i brunnarna genom att snabbt vända plattan upp och ned över en avloppsvask som är godkänd för biologiska vätskor. Tänk på att proven kan vara infektiösa. Sug upp restfukt från de tömda plattorna med pappershandukar.
5. Tvätta brunnarna tre gånger med minst 200 µL utspädd tvättbuffert. Häll av och sug upp restfukt efter varje tvättning.
6. Tillsätt 100 µL IgG/IgM-konjugat 1 till varje brunn.
7. Inkubera under 30±5 minuter vid 18 – 25°C.
8. Upprepa stegen 4 och 5.
9. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
10. Inkubera under 30±5 minuter vid 18 – 25°C. **Häll inte av vätskan.**
11. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn, i samma ordning och med samma takt som tillsatsen av substrat. Knacka försiktigt på brunnarna för att blanda.
12. Avläs plattorna vid 550 nm (540 - 565 nm) inom 24 timmar.

BERÄKNINGAR OCH BEDÖMNING AV RESULTATET

Vid beräkning och bedömning av resultatet skall varje analys behandlas separat.

Kvalitativ analys

Beräkna absorbanskvoten (optisk täthet) för de positiva och negativa kontrollerna och för patientproven.

$$\text{Absorbanskvoten} = \frac{\text{Absorbansvärdet för patientprov eller kontroll}}{\text{Medelvärdet av absorbansvärdet för referenskontrollen}}$$

Användaren bör beräkna en gräns mellan positiva och negativa svar som är specifik för den aktuella patientpopulationen. Resultatet från de patientpopulationer som medverkat vid Euro-Diagnosticas kliniska studier indikerar följande gränser:

Absorbanskvot

<0.95

≥0.95 till ≤1.0

>1.0

Bedömning av resultatet

negativ

gränsfall - analysen bör göras om

positiv

Kvantitativ analys

Avsätt medelvärdet för standardernas absorbans mot \log_{10} för standardkoncentrationerna (se tabellen nedan) på lämpligt millimeterpapper. Därefter kan koncentrationerna i kontroller och patientprov avläsas från standardkurvan. En typisk kurva visas nedan som ett exempel; den får inte användas för avläsning av resultat. Kurvpassning enligt principen om 4 parametrar, logistisk (4PL), log/logit eller spline kan också ge godtagbart resultat.

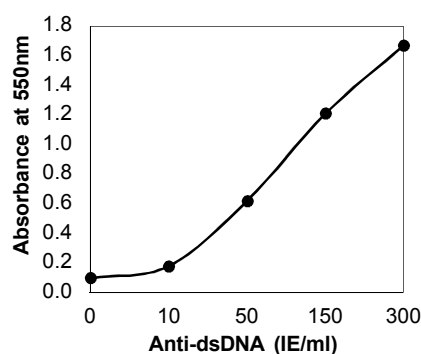
Prov vilkas absorbans ligger högre än absorbansen hos standardprov 5 (100 IE/mL) ligger utanför analysområdet och bör rapporteras som >100 E/mL. En ny analys bör göras med anpassning av utspädningen.

OBS: Som vid alla analyser av antikropps-koncentrationer är det de facto antikropparnas aktivitet i provet som mäts, snarare än deras koncentration. Aktiviteten kan påverkas av flera faktorer, exempelvis aviditeten.

Standardkoncentrationer

Standarder	Koncentration IE/mL
1	0
2	10
3	50
4	150
5	300

Typisk standardkurva



KVALITETSSÄKRING

Se till att plattavläsaren får föreskrivet underhåll och kalibreras enligt tillverkarens anvisningar. Kontrollera att rätt våglängd används.

Användarna bör se till att de är helt införstådda med analysanvisningarna, särskilt avsnittet Varningar och försiktighetsmått, liksom med beskrivningen av hantering och förfarande. Användarna bör kunna visa att de kan uppnå värden i fråga om precision och rapporterbara intervall för analysresultaten som kan jämföras med tillverkarens uppgifter, innan resultat från analys av patientproven rapporteras. Det är lämpligt att dubblera förutspädda positiva och negativa kontroller vid alla analyser, för att därigenom kunna kontrollera testproceduren. Sätt den användningsklara referenskontrollen i två brunnar vid alla kvalitativa analyser.

Förutsatt att de precisionsvärden som tillverkaren uppger kan uppnås, måste varje analys förkastas där någon av kontrollerna faller utanför specifikationerna nedan. Sådana analysresultat skall inte rapporteras. Användaren kan upprepa analysen efter granskning av sina rutiner, eller kontakta leverantören/tillverkaren. Vid förnyad analys skall nya spädningar göras av respektive kontroller och patientprov. Laboratorierna kan vilja inkludera egna kontroller vid varje analys. Sådana kontroller skall förvaras vid högst -20° C eller lägre och bör inte omfrysas när de tinats. Konserveringsmedel som natriumazid i koncentrationen 0,1% (m/v) påverkar inte analysresultaten.

De nivåer av analyt som identifierats för olika sjukdomar är de som tillverkaren har fastställt för givna populationer, och behöver inte med säkerhet motsvara värden som anges i litteraturen. Prevalens, samband med specifika sjukdomar, referensintervall och lämpliga gränsvärden bör beräknas för den speciella patientpopulation som användaren betjänar.

Specifikationer för kontrollernas absorptionskvot

Analystyp	Specifikationer	
Kvalitativ (kvoter)	Absorbans positiv kontroll Absorbans referenskontroll	se etikett för positiv kontroll
	Absorbans negativ kontroll Absorbans referenskontroll	<0.95
Kvantitativ	På etiketten till den positiva kontrollen anges godtagbart förväntat intervall (IE/mL)	
	Den negativa kontrollens värde skall vara lägre än 30 IE/mL	

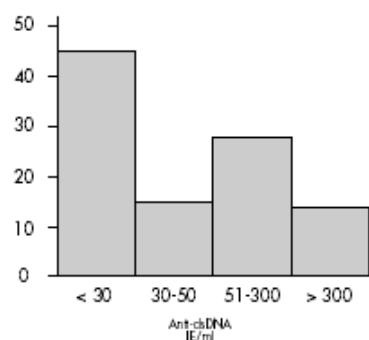
FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Följande tabell är endast avsedd som tolkningsguide. Vi rekommenderar att användare av DIASTAT® Anti-dsDNA kit fastställer mätområden för de populationer som täcks av deras egna laboratorier.

Mätområde (IE/mL) för anti-dsDNA	Tolkning
< 30	Negativ för antikroppar mot dsDNA.
≥ 30 - ≤ 50	Gränsfall för antikroppar mot dsDNA. Sannolik SLE eller annan bindvävssjukdom. Överväg annat test för differentialdiagnos (t.ex. DIASTAT® Anti-Sm analys) och behovet av upprepad testning med avseende på anti-dsDNA på senare prov.
> 50 - ≤ 300	Positiv för antikroppar mot dsDNA. Sannolik SLE.
> 300	Starkt positiv för antikroppar mot dsDNA. Starkt symptomatisk för SLE.

Asymptomatiska prover

Etthundranittiotvå (192) serumprover från asymptomatiska individer analyserades med DIASTAT® Anti-dsDNA kit. Det negativa gränsvärdet definierades som medelvärde plus två standardavvikelser och beräknades vara 30 IE/mL. Etthundranittio (190) prover (99%) visade negativt resultat för antikroppar mot dsDNA när detta värde användes. Det asymptomatiska referensvärdet var därför satt till <30 IE/mL.

**SLE-prover**

Tvåhundrafemtiosju (257) serumprover erhöles från patienter med kliniskt dokumenterad SLE. Av dessa var 142 (55 %) positiva enligt DIASTAT® anti-dsDNA test. Den generella frekvensfördelningen av anti-dsDNA-antikroppar i dessa SLE-patienter illustreras i bild till höger.

Icke-SLE-prover

Ytterligare 119 prov från icke-SLE-sjukdomar gruppanalyserade map-Anti-dsDNA-nivåer. De data som erhöles sammanfattas nedan:

Sjukdom	Negativ (0-30 IE/mL)	Svagt positiv > (30-50 IE/mL)	Positiv > 51-300 IE/mL
Reumatoid artrit	32	2	1
Polymyosit	22	1	-
Sjögrens syndrom	25	1	-
Virusinfektion	27	1	-
Hypergammaglobulemia	6	1	-

PRESTANDA**Jämförelse med ett annat ELISA-test**

Prestanda jämfördes med ett annat kommersiellt tillgängligt ELISA-kit, genom analys av 338 serumprov, (100 asymptomatiska prover och 238 från patienter med konstaterad SLE) analyserades parallellt med DIASTAT® Anti-dsDNA kit och en annan ELISA. För DIASTAT® kit användes ett gränsvärde på 50 IE/mL och för det andra ELISA-kitet användes ett värde på 80 IE/mL. Svaga positiva resultat som fastställdes av båda analyser exkluderades.

		DIASTAT		Total
		+ve	-ve	
ELISA	+ve	93	12	105
	-ve	7	226	233
	Total	100	228	338

Total korrelation = 94%

Bra korrelation gavs av DIASTAT® anti-dsDNA med både Farr radioimmunoassay och Crithidia luciliae immunofluorescence assay.

Spädningsegenskaper

Fyra spädningar av fyra patientprover analyserades i tre separata analyser med hjälp av tre separata kitsatser. Följande tabell visar medelvärden och återvinning efter korrigering för utspädning.

Prov	Spädning	Medelvärde (IE/mL)	Återvinning (%)
1	A	171,3	100
	A/2	79,5	93
	A/4	39,8	93
	A/8	19,7	92
2	A	486,6	100
	A/2	210,9	87
	A/4	116,3	96
	A/8	57,6	95
3	A	146,4	100
	A/2	67,1	92
	A/4	33,3	91
	A/8	18,1	99
4	A	153,9	100
	A/2	89,1	116
	A/4	44,6	116
	A/8	26,5	137

Precision

- Precisionen inom analys** bestämdes genom test med tre olika kontroller, i 12 replikat.

Kontroll	Medelvärde (IE/mL)	% CV
1	22,4	6,0
2	66,9	4,6
3	104,6	4,5

- Precisionen mellananalyser** bestämdes genom test med tre olika kontroller i totalt 50 analysserier. Fem assistenter utförde analyserna med kit från tre olika satser.

Kontroll	Medelvärde (IE/mL)	% CV
1	22,2	8,7
2	65,3	9,1
3	105,2	8,1

BEGRÄNSNINGAR













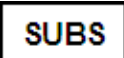
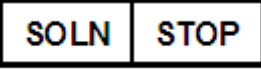
1. Även om närvaron av antikroppar mot dsDNA med hög titer antyder SLE, måste dessa uppgifter beaktas mot bakgrunden av andra kliniska fynd och laboratorieresultat.
2. En del individer kan ha hög nivå med dsDNA-antikroppar med ringa eller inget belägg för klinisk sjukdom. Å andra sidan kan en del SLE-patienter ha ej fastställbara nivåer av dessa antikroppar.
3. Medan IgG-antikroppar mot DNA dominerar i SLE, kan IgM-antikroppar hittas tillsammans med IgG i en del prov. Prover som innehåller höga nivåer av IgM och låga nivåer av IgG kan inte producera positiva resultat i tester som endast mäter IgG-antikroppar¹¹. DIASTAT[®] Anti-dsDNA Assay har konfigurerats att detektera både IgG- och IgM-antikroppar mot dsDNA.
4. När DIASTAT[®] Anti-dsDNA kit används för att övervaka antikroppsnivåer, är det tillrådligt att använda samma typ av prov (serum eller plasma) under hela tiden för studien.

REFERENSER

1. Tan, E.M. 1982. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.* 33: 167-240.
2. Morrow, J. and Isenberg, D. 1987. In "Autoimmune Rheumatic Diseases," Blackwell.
3. Tan, E.M. 1989. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Ad. Immunol.* 44: 93-151.
4. Tan, E.M., *et al.* 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum* 25:1271-1277.
5. Swaak, A.J.G., *et al.* 1982. Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. *Ann. Rheum. Dis.* 41: 388-395.
6. Smeenk, R., *et al.* 1990. Antibodies to DNA in patients with systemic lupus erythematosus. Their role in the diagnosis, the followup and the pathogenesis of the disease. *Clin. Rheum.* 9: 100-110.
7. Borg, E.J., *et al.* 1990. *Measurement of increases in anti-dsDNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in SLE.* *Arth. Rheum.* 33: 634-643.
8. Halbert, S.P., Karsh, J., Anken, M. 1981. Studies on autoantibodies to deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleoprotein with enzymeimmunoassay (ELISA). *J. Lab. Clin. Med.* 97: 97-111.
9. Feltkamp, T.E.W., Kirkwood, T.B.L., Maini, R.N., Aarden, L.A. 1988. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. *Ann. Rheum. Dis.* 47: 740-746.
10. Data on file and available on request.
11. Isenberg, D.A., Schoenfeld, Y., Schwartz, R.S. 1984. Multiple serologic reactions and their relationship to clinical activity in systemic lupus erythematosus, Sjögren's Syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 27: 132-138.
12. HHS Publication No. 93-8395, 3rd ed. May 1993. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* Washington, DC: US Department of Health and Human Services.
13. *Manual Guide – Safety Management No. CDC-22 Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts.* April 30, 1976. Atlanta, GA: Centers for Disease Control.

SAMMANFATTNING AV FÖRFARANDET

1. Späd patientprov samt positiva och negativa kontroller 1:101.
2. Tillsätt 100 µL av referenskontroll/standard i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller, samt patientprov till respektive brunnar på mikrotiterstripet.
3. Inkubera under 60±10 minuter vid 18-25° C.
4. Tvätta plattan 3 gånger.
5. Tillsätt 100 µL IgG-/IgM-konjugat till varje brunn.
6. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
7. Tvätta plattan 3 gånger.
8. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
9. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
10. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn.
11. Avläs absorbansen vid 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.
	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning

BUF	WASH	16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag			dsDNA-coated wells and strip holder / Cupules enduites de ADNdb et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con dsDNA / dsDNA-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di dsDNA e supporto per strip / dsDNA-klädda brunnar och striphållare
DIL	SPE	5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL	X		Anti-dsDNA Standards 1-5/ Etalons anti-ADNdb 1-5 / Estandares Anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA Standards 1-5 / Standard anti-dsDNA 1-5 / Anti-dsDNA-standarder
CONTROL	REF		Anti-dsDNA Reference Control/ Témoins de référence anti-ADNdb / Control de Referencia Anti-dsDNA / Anti-dsDNA Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-dsDNA / Anti-dsDNA referenskontroll
CONTROL	+		Positive Control/ Témoins positive / Control Positivo / Positiv-Kontrolle / Controllo Positivo / Positiva kontroll
CONTROL	-		Negative Control/ Témoins negatif / Control Negativo / Negativ-Kontrolle / Controllo negativo / Negativ kontroll

SVAR LIFE SCIENCE AB
Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00
E-mail: info@svarlifescience.com
www.svarlifescience.com