Instructions for Use

Anti-dsDNA IgG ELISA

IVD

CE

REF EIA-3438

Σ 96

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

(2021-02-16_4)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Por favor, use apenas a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.

1 INTENDED PURPOSE EN 4
2 PRINCIPLE OF THE TEST 4
3 WARNINGS AND PRECAUTIONS 4
4 CONTENTS OF THE KIT 5
5 MATERIALS REQUIRED 5
6 SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING 6
7 STORAGE AND STABILITY 6
8 PROCEDURAL NOTES 6
9 PREPARATION OF REAGENTS 6
10 PREPARATION OF SAMPLES 6
11 TEST PROCEDURE 7
12 VALIDATION 7
13 CALCULATION OF RESULTS 7
14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 8
15 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE 9

1 ZWECKBESTIMMUNG DE 10
2 TESTPRINZIP 10
3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN 10
4 LIEFERUMFANG 11
5 ERFORDERLICHE AUSRÜSTUNG 11
6 PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG 12
7 LAGERUNG UND HALTBARKEIT 12
8 ALLGEMEINE HINWEISE 12
9 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 12
10 PROBENVORBEREITUNG 12
11 TESTDURCHFÜHRUNG 13
12 VALIDIERUNG 13
13 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE 13
14 TESTCHARAKTERISTIKA 14
15 GRENZEN DES VERFAHRENS 15

1 DESTINAZIONE D'USO IT 16
2 METODOLOGIA 16
3 INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI 16
4 CONTENUTO DEL KIT 17
5 MATERIALE NECESSARIO 17
6 RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI 18
7 CONSERVAZIONE E STABILITÁ 18
8 AVVERTENZE OPERATIVE 18
9 PREPARAZIONE DEI REAGENTI 18
10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI 18
11 ESECUZIONE DEL TEST 19
12 CONVALIDA 19
13 CALCOLO DEI RISULTATI 19
14 CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO 20
15 LIMITI DEL PROCEDIMENTO 21

1 FINALIDAD PREVISTA ES 22
2 METODOLOGÍA 22
3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 22
4 CONTENIDO DEL KIT 23
5 EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO 23
6 RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION 24
7 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD 24
8 NOTAS TECNICAS 24
9 PREPARACIÓN DE REACTIVOS 24
10 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 24
11 PROCEDIMIENTO 25
12 VALIDACIÓN 25
13 INTERPRETACION DE RESULTADOS 25
14 LOS CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO 26
15 LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO 27

1 DESTINATION FR 28
2 METHODOLOGIE 28
3 PRECAUTIONS D'USAGE 28
4 CONTENU DU COFFRET 29
5 MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI 29
6 OBTENTION, STOCKAGE ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS 30
7 STOCKAGE ET STABILITE 30
8 RECOMMANDATIONS 30
9 PREPARATION DES REACTIFS 30
10 ECHANTILLONS PATIENT 30
11 MODE OPERATOIRE 31
12 VALIDATION 31
13 RESULTATS 31
14 PERFORMANCES DE LA TROUSSE 32
15 LIMITES DU PROCEDE 33

1 FINALIDADE PREVISTA PT 34
2 METODOLOGIA 34
3 AVISOS E PRECAUÇÕES 34
4 CONTEÚDO DO KIT 35
5 MATERIAIS NECESSÁRIOS 35
6 COLETA DA AMOSTRA, ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO 36
7 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE 36
8 NOTAS DE PROCEDIMENTO 36
9 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES 36
10 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA 36
11 EXECUÇÃO DO TESTE 37
12 VALIDAÇÃO 37
13 CÁLCULO DOS RESULTADOS 37
14 VALORES DE REFERÊNCIA 38
15 LIMITES DO PROCESSO 39

1 URČENÝM ÚČELEM CS 40
2 PRINCIP TESTU 40
3 UPOZORNĚNÍ A PREVENCE 40
4 OBSAH SOUPRAVY 41
5 POTŘEBNÉ VYBAVENÍ 41
6 ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ 42
7 SKLADOVÁNÍ A STABILITA 42
8 POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU 42
9 PŘÍPRAVA REAGENCIÍ 42
10 PŘÍPRAVA VZORKŮ 42
11 TESTU PRECEDURE 43
12 VALIDACE 43
13 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ 43
14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 44
15 HRANICE METODY 45

1 ΠΡΟΒΛΕΠΌΜΕΝΗ ΧΡΉΣΗ EL 46
2 ΜΕΘΟΔΟΣ 46
3 ΥΠΟΔΕΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ 46
4 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ 47
5 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ 47
6 ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ 48
7 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ 48
8 ΓΕΝΙΚΕΣ ΥΠΟΔΕΙΞΕΙΣ 48
9 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ 48
10 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ 48
11 ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ 49
12 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ 49
13 ΕΡΜΗΝΕΊΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΆΤΩΝ 49
14 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΆ ΠΡΟΪΌΝΤΟΣ 50
15 ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ 51

16 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA / RÉFÉRENCES / REFERÊNCIAS LITERÁRIAS / REFERENCE / / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΈΣ ΑΝΑΦΟΡΈΣ 52

SYMBOLS USED 53

EN

1 INTENDED PURPOSE

Anti-dsDNA IgG ELISA is a test system for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against double-stranded DNA in human serum or plasma.

This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

The test is used as an aid in the differential diagnosis of inflammatory autoimmune diseases, especially systemic lupus erythematosus (SLE). Autoantibodies to dsDNA are diagnostic markers for SLE and levels may be elevated during active disease. Evaluation of a test result should always take into account all clinical and laboratory diagnostic findings.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The wells of the microtitre plate are coated with highly purified dsDNA (dsDNA). The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components.

Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product.

The intensity of the yellow color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3´,5,5´-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
  Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
- Exposure controls / personal protection:
  Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
- Conditions to avoid:
  Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
- For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

4 CONTENTS OF THE KIT

Symbols		Sufficient for 96 determinations
MICROPLATE	1	One divisible ***microplate*** consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Calibrator A*** 0 IU/mL, containing serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Calibrator B*** 12.5 IU/mL, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Calibrator C*** 25 IU/mL, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Calibrator D*** 50 IU/mL, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Calibrator E*** 100 IU/mL, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Calibrator F*** 200 IU/mL, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Control positive***, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Control negative***, containing dsDNA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN_3 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
DILUENT	20 mL	***Sample Buffer PD***, containing PBS, BSA, detergent, preservative NaN_3 0.09%, yellow, concentrate (5 x).
CONJUGATE	15 mL	***Enzyme Conjugate***; containing anti-human **IgG** antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative Proclin 0.05%, light red. Ready to use.
TMB	15 mL	***TMB Substrate***; containing 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin, colourless. Ready to use.
STOP	15 mL	***Stop Solution***; contains acid. Ready to use.
WASH	20 mL	***Wash Buffer***, containing Tris, detergent, preservative NaN_3 0.09%; 50X conc.
	1	Instruction for Use
	1	Certificate of Analysis

5 MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µL
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µL, 100 µL and 1000 µL
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 mL and 100 mL
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

6 SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2 °C - 8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

7 STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2 °C - 8 °C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production. Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2 °C - 8 °C. We recommend consumption on the same day.

8 PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20 °C - 28 °C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

9 PREPARATION OF REAGENTS

WASH Wash Buffer

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 mL prior to use.

DILUENT Sample Buffer PD

Prior to use dilute the contents (20 mL) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 mL.

10 PREPARATION OF SAMPLES

Dilute patient samples **1:100** before the assay:

Put 990 µL of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µL of sample. Mix well.

Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

11 TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette **100 µL** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for **30 minutes** at room temperature (20 °C - 28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µL** of wash solution.
4. Dispense **100 µL** of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µL** of wash solution.
7. Dispense **100 µL** of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **15 minutes** at room temperature
9. Add **100 µL** of stop solution to each well of the modules
10. Incubate for **5 minutes** at room temperature.
11. **Read** the optical density at 450 nm (reference 600-690 nm) and calculate the results. The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... patient sample, A-F calibrators, C+, C- controls

12 VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit.

If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

13 CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Calibration

This assay system is calibrated against the international reference preparation WHO Wo/80 for human anti-dsDNA IgG antibodies as 200 IU/mL.

14.2 Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 200 IU/mL

14.3 Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay:

Cut-off : 20 IU/mL

14.4 Interpretation of results

Negative: < 20 IU/mL

Positive: ≥ 20 IU/mL

14.5 Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay. Activity for each dilution was calculated means of SMC®Tecnology.

Sample	Dilution	Observed [IU/mL]	Expected [IU/mL]	O/E [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
	1:200	50.6	52.1	97
	1:400	24.9	26.1	95
	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
	1:200	68.9	67.7	102
	1:400	35.2	33.8	104
	1:800	18.2	16.9	108

14.6 Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 1 IU/mL

14.7 Reproducibility

Intra-assay precision:

Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision:

Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean [IU/mL]	CV [%]
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Inter-Assay		
Sample	Mean [IU/mL]	CV [%]
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

14.8 Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL) or lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera or plasma.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin).

However, for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

14.9 Study results

Study population	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human serum	115	1	0.9

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Sensitivity:	81.2 %
Specificity:	98.6 %
Overall agreement:	88.6 %

15 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

DE

1 ZWECKBESTIMMUNG

Anti-dsDNA IgG ELISA ist ein Testsystem für die quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) in humanem Serum oder Plasma.

Dieses Produkt ist ausschließlich für die professionelle Anwendung durch Fachpersonal in der in vitro Diagnostik bestimmt.

Der Test unterstützt die Differentialdiagnostik von entzündlichen Autoimmunkrankheiten, insbesondere beim systemischen Lupus erythematodes (SLE). Autoantikörper gegen dsDNA sind diagnostische Marker für einen SLE und die Antikörperspiegel können mit der Krankheitsaktivität ansteigen. Das Testergebnis sollte immer unter Berücksichtigung aller klinischen und labordiagnostischen Befunde bewertet werden.

2 TESTPRINZIP

Die Kavitaten der Mikrotiterplatte sind beschichtet mit hochgereinigter dsDNA (dsDNA). Die Bestimmung basiert auf dem Prinzip eines indirekten ELISA mit den folgenden Schritten:

Spezifische Antikörper, die in der zu untersuchenden Probe enthalten sind, binden an die Antigene, mit denen die Oberflächen der Reaktionskavitäten beschichtet sind. Ein auf die anschließende Inkubation folgender Waschschritt entfernt alle nicht gebundenen oder unspezifisch gebundenen Moleküle. Das zugegebene Enzymkonjugat bindet an die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach Inkubation wird in einem zweiten Waschschritt überschüssiges Konjugat entfernt. Das Enzymkonjugat setzt zugefügtes Substrat in ein blaugefärbtes Produkt um. Durch Zugabe von Säure entsteht ein gelbgefärbtes Endprodukt. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert mit der Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplexen und wird über ein optisches Modul bei 450 nm gemessen.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle Reagenzien dieser Testpackung sind ausschließlich zur Anwendung durch Fachpersonal in der in vitro Diagnostik bestimmt.
- Komponenten, die Humanserum enthalten, wurden mit FDA anerkannten Methoden auf HBsAg, HCV, HIV1 und HIV2 geprüft und für negativ befunden. Da kein Test die Abwesenheit von HBsAg, HCV, HIV1 und HIV2 garantieren kann, empfehlen wir, alle Serum enthaltenden Bestandteile der Testpackung wie potentiell infektiöses Material zu handhaben.
- Rinderserumalbumin (BSA), das in den Komponenten enthalten ist, wurde auf BSE geprüft und für negativ befunden.
- Kontakt mit dem Enzymsubstrat TMB (3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidine) vermeiden.
- Die Stopplösung enthält Säure. Diese Konzentration ist als nicht gefährlich eingestuft. Hautkontakt vermeiden.
- Kontrollen, Probenpuffer und Waschpuffer enthalten Natriumazid 0,09% als Konservierungsmittel. Diese Konzentration ist nicht als gefährlich eingestuft.
- Das Enzymkonjugat enthält 0,05% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Diese Konzentration ist als nicht gefährlich eingestuft.

Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten:

- Erste-Hilfe-Maßnahmen:
  Bei Hautkontakt sofort gründlich mit Wasser und Seife waschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe ablegen und vor der Wiederverwendung waschen. Sollte die Stopplösung in Kontakt mit der Haut kommen, gründlich mit Wasser waschen. Nach Augenkontakt das Auge mit weit gespreizten Lidern mindestens 10 Minuten unter fließendem Wasser spülen. Bei Bedarf Arzt aufsuchen.
- Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung:
  Sicherheitsrichtlinien der Guten Laborpraxis beachten. Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Nicht verschlucken. Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen Proben oder Bestandteile des Produktes gehandhabt werden, nicht essen, trinken, rauchen oder schminken. Verschüttungen mit inertem Material aufnehmen und einer geeigneten Abfallentsorgung zuführen.
- Persönliche Schutzausrüstung:
  Schutzhandschuhe aus Nitril oder Latex tragen. Schutzbrille tragen. Bei zweckbestimmter Anwendung sind keine gefährlichen Reaktionen bekannt.
- Zu vermeidende Bedingungen:
  Da das TMB Substrat lichtempfindlich ist, im Dunkeln lagern.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollseren sollten beachtet werden.

4 LIEFERUMFANG

Symbol		Ausreichend für 96 Bestimmungen
MICROPLATE	1	Eine Mikrotiterplatte mit 12 Modulen mit jeweils 8 Kavitäten. Gebrauchsfertig..
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Standard A*** 0 IU/mL, enthält Serum/Puffer Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Standard B*** 12.5 IU/mL, enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Standard C*** 25 IU/mL, enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Standard D*** 50 IU/mL, enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Standard E*** 100 IU/mL, enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Standard F*** 200 IU/mL, enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Positive Kontrolle,*** enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig. Konzentrationsangabe im Analysenzertifikat.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Negative Kontrolle,*** enthält dsDNA-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN_3 0,09%). Gebrauchsfertig. Konzentrationsangabe im Analysenzertifikat.
DILUENT	20 mL	***Probenpuffer PD*****;** gelb; enthält PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel NaN_3 0,09%. Konzentrat 5x.
CONJUGATE	15 mL	***Enzymkonjugat;*** rosa, enthält anti-human **IgG**-Antikörper, POD markiert, in PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel Proclin 0,05%. Gebrauchsfertig.
TMB	15 mL	***TMB-Substrat;*** enthält 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin. Gebrauchsfertig.
STOP	15 mL	***Stopplösung;*** enthält Säure. Gebrauchsfertig.
WASH	20 mL	***Waschpuffer;*** enthält Tris, Detergens, NaN_3 0,09%. Konzentrat 50x.
	1	Gebrauchsanweisung
	1	Qualitätskontrollzertifikat

5 ERFORDERLICHE AUSRÜSTUNG

- Plattenphotometer mit einem optischen Filter der Messwellenlänge 450 nm;
  Bichromatische Messung mit Referenzwellenlänge 600 - 690 nm wird empfohlen.
- Auswertesoftware
- Mehrkanalpipette oder Multipette
- Vortex-Mixer
- Mikropipetten mit Einmalspitzen für 10 µL, 100 µL,1000 µL
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Messzylinder für 100 mL und 1000 mL
- Gefäß zur Aufbewahrung der Waschlösung

Automation:
Dieser ELISA Test kann auf automatisierten Systemen angewendet werden. Die Anwendung ist auf dem jeweiligen Automaten zu validieren. Weitere Informationen auf Anfrage.

6 PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG

- Blutproben sind nach den geltenden Verfahren zu gewinnen.
- Blut gerinnen lassen und Serum durch Zentrifugation gewinnen.
- Proben sollten klar und nicht hämolytisch sein. Die Verwendung hämolytischer oder lipämischer Proben sollte vermieden werden, stört diesen Test jedoch nicht.
- Serum- und Plasmaproben können gekühlt bei 2 °C - 8 °C bis zu 5 Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren werden.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden! Verlust an Antikörperaktivität möglich.
- Die Verwendung hitzeinaktivierter Seren wird nicht empfohlen.

7 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Lagerung der Testpackung bei 2 °C - 8 °C im Dunkeln.
- Reagenzien während der Lagerung und Anwendung nicht Hitze, Sonne oder starkem Licht aussetzen.
- Mikrotiterplatte versiegelt und mit Trockenmittel versehen im mitgelieferten Klippbeutel lagern.
- Die Haltbarkeit der nicht-geöffneten Testpackung beträgt 18 Monate vom Tag der Produktion an. Die nicht-geöffneten Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum der Testpackung stabil. Siehe Etikett der einzelnen Charge.
- Verdünnter Waschpuffer und verdünnter Probenpuffer sind bei 2 °C - 8 °C mindestens 30 Tage stabil. Wir empfehlen die Gebrauchslösungen am selben Tag zu verbrauchen.

8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Komponenten dieses Tests nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr benutzen.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Produkte dürfen nicht ausgetauscht werden.
- Alle Materialien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) bringen.
- Proben und Reagenzien vorbereiten. Sobald der Test gestartet ist, ohne Unterbrechung abarbeiten.
- Doppelbestimmungen können durchgeführt werden. Dadurch können Pipettierfehler offensichtlich werden.
- Reihenfolge der Arbeitsschritte genau einhalten.
- Immer frische Probenverdünnungen verwenden.
- Alle Reagenzien und Proben auf den Boden der Kavitäten pipettieren.
- Um Verschleppungen zu vermeiden, Pipettenspitze wechseln zwischen den einzelnen Proben / Kontrollen.
- Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sorgfältig waschen und letzte Reste Waschpuffer entfernen.
- Alle Inkubationszeiten genau einhalten.
- Die Kavitäten der Mikrotiterplatten sind nicht wiederverwendbar.

9 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschpuffer (WASH)

Vor Gebrauch den Inhalt des Waschpuffer-Konzentrates (50x) mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL verdünnen.

Probenpuffer PD (DILUENT)

Vor Gebrauch den Inhalt (20 mL) einer Flasche Probenpuffer 5x-Konzentrat durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 mL verdünnen.

10 PROBENVORBEREITUNG

Patientenproben **1:100** verdünnen:

990 µL verdünnten Probenpuffer im Polystyrolröhrchen vorlegen und 10 µL Probe zugeben. Mischen.

Beachten: Standards und Kontrollen sind bereits gebrauchsfertig.

11 TESTDURCHFÜHRUNG

Ausreichend Mikrotiterplatten-Module zum Ansatz von Standardreihe, Kontrollen und Patientenproben vorbereiten.

1. Jeweils **100 µL** der Standards, Kontrollen und vorverdünnten Patientenproben in die Kavitäten pipettieren.
2. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
3. Kavitäten entleeren und **3-mal waschen** mit jeweils **300 µL** Waschpuffer.
4. Jeweils **100 µL** Enzymkonjugat in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren.
5. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
6. Kavitäten entleeren und **3-mal waschen** mit jeweils **300 µL** Waschpuffer.
7. Jeweils **100 µL** TMB-Substrat in die Kavitäten pipettieren.
8. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
9. Jeweils **100 µL** Stopplösung in jede Kavität dazu pipettieren.
10. **5 Minuten** bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
11. Optische Dichte bei 450 nm (Referenz 600-690 nm) messen und die Ergebnisse berechnen. Die Farbentwicklung ist mindestens 30 Minuten stabil. Innerhalb dieser Zeit optische Dichte messen.

Beispiel für ein Pippettierschema:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Probe, A-F Standard, C+, C- Kontrolle

12 VALIDIERUNG

Dieser Test ist nur gültig, wenn die bei 450 nm gemessenen optischen Dichten der Standards und Kontrollen, sowie die Testergebnisse der Kontrollen mit den Referenzbereichen des Analysenzertifikates übereinstimmen.

Trifft eine dieser Qualitätskriterien nicht zu, sind die Testergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden.

13 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Für quantitative Resultate erstellt man eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte der Standards gegen die Standardkonzentrationen. Die Probenkonzentration kann durch Interpolation auf der Standardkurve abgelesen werden.

Eine Auswertesoftware mit 4-Parameter-Kurvenanpassung und lin-log Koordinaten für optische Dichte und Konzentration ist die Methode der Wahl.

14 TESTCHARAKTERISTIKA

14.1 Kalibrierung

Das Testsystem ist gegen die internationale Referenzpräparation WHO Wo/80 anti-dsDNA IgG Antikörper auf 200 IU/mL kalibriert.

14.2 Messbereich

Der Messbereich dieses ELISAs beträgt: 0 - 200 IU/mL

14.3 Normalwerte

Im Rahmen einer Normbereichsstudie mit Proben von gesunden Blutspendern wurden für diesen ELISA die folgenden Werte ermittelt:

Cut-off: 20 IU/mL

14.4 Interpretation der Ergebnisse

Negativ: < 20 IU/mL

Positiv: ≥ 20 IU/mL

14.5 Linearität

Patientenproben mit hoher spezifischer Antikörperkonzentration wurden in Probenpuffer linear verdünnt, um den dynamischen Messbereich des Assays darzustellen. Die Antikörperaktivität jeder Verdünnungsstufe wurde auf einer Standardkurve mit 4-Parameter-Kurvenanpassung abgelesen.

Probe	Verdünnung	Gemessen [IU/mL]	Erwartet [IU/mL]	G/E [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
	1:200	50.6	52.1	97
	1:400	24.9	26.1	95
	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
	1:200	68.9	67.7	102
	1:400	35.2	33.8	104
	1:800	18.2	16.9	108

14.6 Nachweisgrenze

Die funktionale Sensitivität wurde getestet und bestimmt mit 1 IU/mL

14.7 Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Präzision:

Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben mit je 24 Bestimmungen in einem Lauf. Ergebnisse der Präzision in der Serie sind in der Tabelle zusammengefasst.

Inter-Assay Präzision:

Der Variationskoeffizient (CV) wurde berechnet für drei Proben aus jeweils 6 Bestimmungen in 5 Läufen. Ergebnisse der Präzision von Lauf-zu-Lauf sind in der Tabelle zusammengefasst.

Intra-Assay		
Probe	Mittelwert [IU/mL]	CV [%]
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Inter-Assay		
Probe	Mittelwert [IU/mL]	CV [%]
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

14.8 Interferenzen

Es konnten keine Interferenzen mit hämolytischen (bis 1000 mg/dL), lipämischen (bis 3 g/dL Triglyceride) oder Seren mit erhöhten Bilirubinwerten (bis 40 mg/dL) beobachtet werden. Wir empfehlen jedoch aus praktischen Gründen die Verwendung von stark hämolytischen oder lipämischen Proben zu vermeiden.

Des Weiteren wurden keine interferierenden Effekte mit Antikoagulantien (EDTA, Heparin, Citrat) beobachtet.

14.9 Studienergebnisse

Studienpopulation	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human serum	115	1	0.9

		Klinische Diagnose		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Sensitivität:	81.2 %
Spezifität:	98.6 %
Diagnostische Effizienz:	88.6 %

15 GRENZEN DES VERFAHRENS

Das Ergebnis ist eine diagnostische Hilfe. Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht auf dem Ergebnis eines einzelnen Tests beruhen, sie sollte durch den behandelnden Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen und labordiagnostischen Befunde erhoben werden.

Die angegebenen Referenzbereiche für pathologische und normale Antikörperkonzentration in der Patientenprobe sollten als Empfehlung angesehen werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich etablieren nach ISO 15189 oder nach anderen anwendbaren Laborrichtlinien.

1 DESTINAZIONE D'USO

IT

Anti-dsDNA IgG ELISA è un test immunometrico per la misurazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG contro dsDNA in campioni di siero umano o plasma.

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale nella diagnostica in vitro.

Questo test contribuisce alla diagnosi differenziale delle malattie infiammatorie autoimmuni, in particolare del lupus eritematoso sistemico (SLE). Gli autoanticorpi anti-dsDNA sono marcatori diagnostici dell'SLE e possono esserne rilevati livelli elevati quando la malattia è in fase attiva. Nel valutare il risultato del test si dovrebbe sempre tenere conto di tutti gli esami diagnostici clinici e di laboratorio.

2 METODOLOGIA

I pozzetti della piastra per microtitolazione sono rivestiti con dsDNA altamente purificato (dsDNA). La determinazione è basata su una reazione immune indiretta legata a un enzima con le seguenti fasi: gli anticorpi presenti nei campioni positivi legano gli antigeni presenti sulla superficie dei due pozzetti di reazione formando un complesso antigene-anticorpo. Dopo un periodo di incubazione, una prima fase di lavaggio rimuove le molecole non legate e le molecole non specifiche legate.

Successivamente l'enzima coniugato aggiunto lega il complesso antigene-anticorpo fissato. Dopo un periodo di incubazione, una seconda fase di lavaggio rimuove l'enzima coniugato non legato. L'aggiunta della soluzione di enzima-substrato provoca idrolisi e la comparsa del colore durante l'incubazione. L'aggiunta di un acido interrompe la reazione formando un giallo prodotto finale.

L'intensità del colore giallo è correlata alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo e può essere misurata fotometricamente a 450 nm.

3 INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI

- Tutti i reagenti di questa confezione di prova sono destinati esclusivamente all'uso da parte di personale specializzato nella diagnostica in vitro.
- I componenti, che contengono siero umano, sono stati testati con metodi riconosciuti dalla FDA per rilevare la presenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2 e sono risultati negativi. Poiché nessun test può garantire l'assenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2, consigliamo di trattare tutti i componenti della confezione di prova contenenti siero come materiale potenzialmente infettivo.
- L'albumina di siero bovino (BSA), contenuta nei componenti, è stata testata per rilevare la presenza di ESB ed è risultata negativa.
- Evitare il contatto con il substrato enzimatico TMB (3,3´,5,5´-tetrametil benzidina).
- Soluzione Stoppante contiene acido. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa. Evitare il contatto con gli occhi.
- Il mezzo di controllo, il tampone e il tampone di lavaggio contengono 0.09% di azoturo di sodio come conservante. Questa concentrazione non è classificata come pericolosa.
- Il coniugato enzimatico contiene 0.05% di ProClin 300 come conservante. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa.

Durante la manipolazione di reagenti, mezzi di controllo e campioni dei pazienti si devono osservare le normali norme di sicurezza e la buona prassi di laboratorio:

- Misure di pronto soccorso: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e accuratamente con acqua e sapone. Togliersi abiti e scarpe contaminati e lavarli prima di usarli nuovamente. Se il liquido del sistema dovesse entrare in contatto con la cute, lavare accuratamente con acqua. Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare con acqua corrente per almeno 10 minuti con le palpebre ben aperte. In caso di necessità consultare un medico.
- Misure in caso di rilascio involontario: osservare le norme di sicurezza della buona prassi di laboratorio. Evitare il contatto con occhi e cute. Non ingerire. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere, fumare o truccarsi nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni oppure i componenti del prodotto. Raccogliere eventuali versamenti con materiale inerte ed eseguire uno smaltimento adeguato dei rifiuti.
- Dispositivi di protezione individuale: indossare guanti protettivi in lattice o nitrile. Indossare occhiali di protezione. In caso di uso conforme non sono note reazioni pericolose.
- Condizioni da evitare: poiché il substrato TMB è fotosensibile, immagazzinare al buio.
- I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni ambientali nazionali e locali.

Osservare le direttive per il controllo di qualità nei laboratori medici riguardanti il trasporto di sieri di riferimento e/o pool di sieri.

4 CONTENUTO DEL KIT

Simboli		Sufficiente per 96 determinazioni
MICROPLATE	1	***Micropiastra*** a pozzetti separabili costituita da 12 strisce da 8 pozzetti. Pronto per l'uso.
CALIBRATOR A	1x 1,5 mL	***Calibratore A*** 0 IU/mL, contenente siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR B	1x 1,5 mL	***Calibratore B*** 12,5 IU/mL, contenente anticorpi dsDNA in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR C	1x 1,5 mL	***Calibratore C*** 25 IU/mL, contenente anticorpi dsDNA in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR D	1x 1,5 mL	***Calibratore D*** 50 IU/mL, contenente anticorpi dsDNA in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR E	1x 1,5 mL	***Calibratore E*** 100 IU/mL, contenente anticorpi dsDNA in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR F	1x 1,5 mL	***Calibratore F*** 200 IU/mL, contenente anticorpi dsDNA in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto per l'uso.
CONTROL +	1x 1,5 mL	***Controllo positivo*** contiene anticorpi dsDNA, PBS, BSA, detergente; NaN_3 0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.
CONTROL −	1x 1,5 mL	***Controllo negativo*** contiene anticorpi dsDNA, PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.
DILUENT	20 mL	***Tampone del campione PD***; giallo; PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09% come conservante, concentrato 5x.
CONJUGATE	15 mL	***Coniugato enzimatico***; rosso chiaro; contiene anticorpi **IgG** antiumani marcati con perossidasi, PBS, BSA, detergente; 0,05% Proclin come conservante. Pronto per l'uso.
TMB	15 mL	***TMB Substrato***. Reagente pronto all'uso.
STOP	15 mL	***Soluzione Stoppante*** (contiene acido). Pronto per l'uso.
WASH	20 mL	***Tampone di lavaggio*****;** contiene elettroforesi triacetato, detergente, NaN_3 0,09% come conservante; concentrato 50x.
	1	Istruzioni per l'uso
	1	Certificato di analisi

5 MATERIALE NECESSARIO

- Lettore di micropiastre con possibilità di misurazione end point, a 450 nm; riferimento 620 nm opzionale
- Software per l'elaborazione dei dati
- Dispensatore multicanale o pipetta sequenziale da 100 mL
- Micropipette con puntali monouso 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Agitatore di tipo vortex
- Orologio da laboratorio
- Acqua distillata oppure deionizzata
- Cilindro di misura per 1000 mL, 100 mL
- Bottiglie di plastica per la conservazione della soluzione di lavaggio

Automazione

Questo saggio ELISA può essere utilizzato su processori automatici aperti ELISA. L'applicazione deve essere convalidata sul rispettivo sistema automatizzato. Le informazioni sono fornite su richiesta.

6 RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di sangue si devono ottenere in conformità alle direttive vigenti.
- Lasciare che il sangue si coaguli e ricavare il siero per centrifugazione.
- L'uso di sieri emolitici, lipemici ed itterici va evitato.
- I campioni di siero e di plasma si possono conservare raffreddati a 2 °C - 8 °C fino a 5 giorni. Se si prevede una conservazione più lunga, i campioni dovrebbero essere aliquotati e surgelati a -20 °C.
- Evitare lo scongelamento ed il congelamento ripetuti! Questo può portare alla perdita variabile dell'attività autoimmune o degli anticorpi.
- L'uso di sieri termoattivati è sconsigliato.

7 CONSERVAZIONE E STABILITÁ

- Immagazzinamento della confezione di prova a 2 °C - 8 °C al buio.
- Durante l'immagazzinamento e l'utilizzo non esporre i reagenti a calore, sole o eccessiva luce.
- Immagazzinare micropiastra nel sacchetto con clip in dotazione, sigillate e con il disseccante.
- La confezione di prova non aperta può essere conservata per 18 mesi dalla data di produzione. I reagenti non aperti sono stabili fino alla scadenza della confezione di prova. Vedere l'etichetta del singolo lotto.
- Il tampone di lavaggio diluito e il tampone del campione diluito sono stabili per almeno 30 giorni a una temperatura di 2 °C - 8 °C. Consigliamo di consumare in giornata le soluzioni pronte.

8 AVVERTENZE OPERATIVE

- Non usare kit scaduti.
- Non intercambiare componenti di kit con diversi numeri di lotto e prodotti.
- Tutti i materiali devono essere conservati a temperatura ambiente.
- Preparare tutti i reagenti ed i campioni. Una volta avviato il ciclo analitico, eseguito la prova senza interruzioni.
- Determinazioni doppie possono essere fatto. In questo modo errori di pipettamento può diventare evidente.
- Utilizzare la procedura analitica indicata.
- Usare sempre campioni freschi.
- Pipettare reagenti e campioni sul fondo del pozzetto.
- Per evitare di riporto o contaminazione, cambiare la punta della pipetta tra i campioni ed i controlli kit differenti.
- Lavare accuratamente i pozzetti e rimuovere tutte le goccioline di tampone di lavaggio al fine.
- Rispettare accuratamente i tempi di incubazione.
- Non riutilizzare piastre già usate.

9 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

WASH Tampone di lavaggio

Il contenuto di ogni flacone del concentrato del tampone di lavaggio (20 mL) va diluito prima dell'uso fino ad un volume finale di 1000 mL (1 litro), aggiungendo dell'acqua distillata.

DILUENT Tampone del campione PD

Prima dell'uso, diluire il contenuto (20 mL) di ciascun flacone di diluente campioni concentrato 5x con acqua distillata o deionizzata fino a un volume finale di 100 mL.

10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prima di utilizzare nel test diluire tutti i campioni dei pazienti **1:100** con il tampone del campione:

Mettete 990 µL di tampone campione diluito in un tubo di polistirolo e aggiungere 10 µL di campione. Mescolare bene.

Nota: I calibratori / controlli sono pronti per l'uso e non necessitano di diluizioni.

11 ESECUZIONE DEL TEST

Prelevare il numero di strip necessario per l'analisi in funzione del numero di campioni, controlli e calibratori

1. Dispensare nei rispettivi pozzetti **100 µL** dei calibratori, controlli e campioni prediluiti.
2. Incubare per **30 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
3. Svuotare i pozzetti e lavare **3 volte con 300 µL** di soluzione di lavaggio
4. Dispensare **100 µL** di coniugato in ciascun pozzetto.
5. Incubare per **15 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
6. Svuotare i pozzetti e lavare **3 volte con 300 µL** di soluzione di lavaggio
7. Dispensare **100 µL** di TMB in ciascun pozzetto.
8. Incubare per **15 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
9. Dispensare **100 µL** di Soluzione Stoppante a ciascun pozzetto.
10. Incubare per **5 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
11. **Leggere** la Densità Ottica a 450 nm (riferimento 600-690 nm) e calcolare il risultato.
    Il colore è stabile per almeno 30 min. Leggere in questo periodo di tempo.

Esempio di un sistema di dispensazione:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Campioni, A-F Calibratore, C+, C- Controllo

12 CONVALIDA

Il test è valido è valido solo se le densità ottiche a 450 nm dei calibratori / controlli ed i risultati di lettura per i controlli cadono nei limiti indicati sul certificato di analisi allegato a ciascun kit.

Se tutti questi criteri non sono riscontrati, i risultati devono essere considerati non validi e il test deve essere ripetuto.

13 CALCOLO DEI RISULTATI

Per ottenere risultati quantitativi riportare la densità ottica di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione del calibratore per costruire una curva di calibrazione. La concentrazione dei campioni da analizzare è determinata tramite la curva di calibrazione così estrapolata.

Software per l'elaborazione dei dati con i 4 parametri curva e lin-log per densità ottica e la concentrazione è il metodo migliore.

14 CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

14.1 Calibrazione

Il sistema di dosaggio è calibrato contro la preparazione di riferimento internazionale WHO Wo/80 per gli anticorpi human anti-dsDNA IgG a 200 IU/mL.

14.2 Campo di misura

Il campo di misura è pari a 0 - 200 IU/mL

14.3 Valori normali

Nell'ambito di uno studio sul campo di riferimento con campioni di donatori di sangue sani sono stati rilevati i seguenti valori:

valore limite 20 IU/mL

14.4 Interpretazione dei risultati

Negativo: < 20 IU/mL

Positivo: ≥ 20 IU/mL

14.5 Linearità

Campioni di pazienti con un'elevata concentrazione di anticorpi specifici sono stati sottoposti a diluizione lineare nel tampone per stabilire il campo dinamico dell'analisi. L'attività degli anticorpi di ogni stadio di diluizione è stata calcolata dalla SMC®Tecnology.

Campione	Diluzione	Osservato [IU/mL]	Previsto [IU/mL]	O/P [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
	1:200	50.6	52.1	97
	1:400	24.9	26.1	95
	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
	1:200	68.9	67.7	102
	1:400	35.2	33.8	104
	1:800	18.2	16.9	108

14.6 Limite di determinazione

Sensibilità funzionale: 1 IU/mL

14.7 Riproducibilità

Precisione intra-assay:

il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni ognuno con 24 definizioni in un ciclo. I risultati della precisione nella serie sono riassunti nella tabella.

Precisione intra-assay:

il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni rispettivamente da 6 definizioni in 5 cicli. I risultati della precisione da ciclo a ciclo sono riassunti nella tabella..

Intra-test		
Campione	Mezzo [IU/mL]	CV [%]
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Inter-test		
Campione	Mezzo [IU/mL]	CV [%]
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

14.8 Interferisce

Non si ha osservato ninguna interferencia con emolitico (fino a 1000 mg/dL), lipoideo (fino a 3 g/dL di trigliceridi) o bilirubina (fino a 40 mg/dL) contenenti siero.

Nessuna osservato effetto di interferencia con anticoagulanti (EDTA, eparina, citrato).

14.9 Risultati dello studio

Popolazione di studio	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human serum	115	1	0.9

		Diagnosi clinica		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Sensitività:	81.2 %
Specificità:	98.6 %
Efficienza diagnostica:	88.6 %

15 LIMITI DEL PROCEDIMENTO

Questo test è una ausilio diagnostico. La diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatta dal medico, dopo tutto i risultati clinici e di laboratorio sono state valutate concernente l'intero quadro clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia dovrebbe essere presa individualmente.

Gli intervalli di riferimento sopra patologiche e normale per gli anticorpi nei campioni dei pazienti devono essere considerati come raccomandazioni solo. Ogni laboratorio deve stabilire i propri range secondo la ISO 15189 o ad altre linee guida del laboratorio applicabili.

ES

1 FINALIDAD PREVISTA

Anti-dsDNA IgG ELISA es una inmunoensayo enzimático para la cuantificación de anticuerpos tipo IgG frente a dsDNA en muestras de suero humano o plasma..

Este producto se ha concebido exclusivamente para su uso profesional en el diagnóstico in vitro.

La prueba se usa como ayuda en el diagnóstico diferencial de las enfermedades autoinmunitarias inflamatorias, especialmente en el lupus eritematoso sistémico (LES). Los autoanticuerpos a dsDNA son marcadores de diagnóstico para LES y los niveles puede estar elevados durante la enfermedad activa. La evaluación de un resultado de la prueba debe tener en cuenta siempre todos los hallazgos de diagnóstico clínicos y de laboratorio.

2 METODOLOGÍA

Los pocillos de la placa de microtitulación se recubren con dsADN altamente purificado (dsADN). La determinación se basa en una reacción inmunológica indirecta ligada a enzimas con los pasos siguientes:
los anticuerpos presentes en muestras positivas se ligan al antígeno revestido en la superficie de los dos pocillos de reacción formando un complejo antígeno-anticuerpo. Tras la incubación, un primer paso de lavado elimina las moléculas no ligadas y las moléculas ligadas no específicas. El conjugado de enzima añadido a continuación se liga al complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado. Tras la incubación, un segundo paso de lavado elimina el conjugado de enzimas no ligado. La adición de la solución de sustrato de enzimas tiene como resultado la hidrólisis y el desarrollo del color durante la incubación. La adición de un ácido detiene la reacción de formación de un color amarillo del producto final.
La intensidad del color amarillo guarda relación con la concentración del complejo anticuerpo-antígeno y puede medirse fotométricamente a 450 nm.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Todos los reactivos de este kit son para su uso profesional para el diagnóstico in vitro.
- Se han analizado todos los componentes que contienen suero humano y el resultado ha sido negativo para los métodos autorizados de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2. Sin embargo, las pruebas no pueden garantizar la ausencia de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2, por lo que todos los reactivos basados en suero humano en este juego se deben manejar como si fuesen contagiosos.
- Se le ha realizado la prueba de EEB a la albúmina de suero bovino (ASB) usada en los componentes y el resultado ha sido negativo.
- Evite el contacto con el sustrato TMB (3,3´,5,5´- tetrametilbencidina).
- Solución de paro contiene ácido, cuya clasificación es de no peligrosa. Evite el contacto con la piel.
- Los tampones de control, de muestra y de lavado contienen 0.09% de ácido de sodio como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.
- Las enzimas conjugadas contienen 0.05% Proclin como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.

Durante el tratamiento de todos los reactivos, de los controles y de las muestras de suero cumpla con la regulación vigente en materia de seguridad en el laboratorio y con las buenas prácticas de laboratorio:

- Medidas de primeros auxilios: en caso de contacto con la piel, lave cuidadosamente la zona con agua y jabón.
- Quítese la ropa y el calzado contaminado y lávelos antes de volverlos a utilizar. Si la piel entra en contacto con los fluidos del sistema, lave la zona cuidadosamente con agua. En caso de contacto con los ojos, aclare con cuidado el ojo abierto con agua corriente durante al menos 10 minutos. En el caso de que sea necesario, consulte a un médico.
- Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia:
- Siga las regulaciones en materia de seguridad en el laboratorio. Evite el contacto con la piel y los ojos. No ingiera el producto. No pipetee nunca con la boca. No coma, beba, fume ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se trabaja con las muestras o con los reactivos del juego. En el caso de derrame, absorba el producto con un material inerte y elimine el producto derramado como corresponda.
- Controles de exposición/ protección personal: utilice guantes de protección de caucho de nitrilo o de látex natural. Use gafas de protección. No se conocen reacciones peligrosas si se usa conforme a su fin.
- Condiciones que se deben evitar: la solución de sustrato es sensible a la luz, se deben almacenar en un lugar oscuro.
- Siga la normativa nacional o regional para eliminar los desechos del laboratorio.

Siga las directrices en materia de realización de controles de calidad en laboratorios médicos mediante controles de ensayo.

4 CONTENIDO DEL KIT

Símbolos		Válido para 96 determinaciones
MICROPLATE	1	***Microplaca*** fracccionable compuesta por 12 tiras de 8 pocillos cada una. Listo para el uso
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Calibrador A*** 0 IU/mL, contiene una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Calibrador B*** 12,5 IU/mL, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Calibrador C*** 25 IU/mL, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Calibrador D*** 50 IU/mL, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Calibrador E*** 100 IU/mL, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Calibrador F*** 200 IU/mL, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Control positiva***, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso. Concentraciones especificadas en certificado de análisis.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Control negativa***, contiene dsDNA anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%), amarillo. Listo para el uso. Concentraciones especificadas en certificado de análisis
DILUENT	20 mL	***Tampón de muestra PD,*** contiene PBS, BSA, detergente, conservante NaN_3 0.09%, amarillo, 5x concentrado.
CONJUGATE	15 mL	***Conjugado***; contiene anticuerpos contra la **IgG** humanas, marcados con HRP; PBS, BSA, detergente, conservante Proclin 0.05%, rojo claro. Listo para el uso.
TMB	15 mL	***TMB solución de substrato;*** contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, incoloro. Listo para el uso.
STOP	15 mL	***Solución de paro***; contiene ácido. Listo para el uso.
WASH	20 mL	***Solución de lavado;*** contiene Tris, detergente, conservante NaN_3 0.09%; 50x concentrado.
	1	Instrucciones de uso
	1	Certificado de Análisis

5 EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO

- Lector de microplacas capaz de leer a punto final a 450 nm; opcional: referencia 620 nm
- Software para cálculo de resultados
- Pipeta multicanal, o de repetición para 100 µL
- Mezclador Vortex
- Micropipetas con jeringas de un solo uso para 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Reloj de laboratorio
- Agua destilada o desionizada
- Probeta graduada para 1000 mL, 100 mL
- Contenedor de plástico para la solución de lavado diluida

Automatización:
Este ensayo ELISA puede ser utilizado en procesadores automáticos abiertos ELISA. La aplicación tiene que ser validado en el sistema automatizado correspondiente. La información se proporciona bajo petición.

6 RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION

- Las muestras de sangre se deben obtener en base a las directivas y regulaciones de vigencia actual.
- Dejar coagular la sangre y obtener el suero mediante centrifugación.
- Se debe prevenir la utilización de sueros hemolíticos, lipémicos e ictéricos.
- Las muestras de suero y plasma pueden conservarse durante un período máximo de 5 días con refrigeración y temperaturas entre 2 °C a 8 °C. En caso de requerir una conservación más larga, se deben alicuotar las muestras y congelarse con una temperatura de -20 °C.
- Se ha de prevenir la repetida congelación y descongelación! Esto puede provocar una pérdida variable de actividad de los autoanticuerpos o anticuerpos.
- No se recomienda la utilización de sueros desactivados frente al calor.

7 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Almacene el kit a 2 °C - 8 °C en un lugar oscuro.
- No exponga los reactivos al calor, al sol o a una luz intensa durante su almacenamiento o uso.
- Almacene la microplaca sellada en la bolsa con pinza suministrada con un secante.
- El tiempo de conservación de los kits sin abrir es de 18 meses desde la fecha de fabricación. Los reactivos sin abrir se mantienen estables hasta la fecha de caducidad del kit. Consulte las etiquetas de cada lote individual.
- Los tampones de lavado diluidos y tampón de muestra se mantienen estables durante al menos 30 días si se almacenan a 2 °C - 8 °C. Recomendamos que se use en el mismo día.

8 NOTAS TECNICAS

- No usar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- No intercambiar componentes de diferentes lotes y productos.
- Todos los componentes deben ser acondicionados a temperatura ambiente antes de su uso (20 °C - 28 °C).
- Preparar todos los reactivos y muestras antes de empezar el ensayo. Una vez iniciado es test debe realizarse sin interrupción.
- Determinaciones dobles puede realizarse. Por este medio los errores de pipeteo puede llegar a ser evidentes.
- Procesar todos los pasos del test en el orden indicado.
- Utilizar siempre las diluciones de muestra recién preparadas.
- Pipetear los reactivos y muestras en el fondo del pocillo.
- Para eliminar arrastre, cambiar las puntas de pipeta entre las muestras y los controles.
- Es importante lavar exaustivamente los pocillos y eliminar las últimas gotas de tampón de lavado.
- Los tiempos de incubación deben controlarse cuidadosamente.
- Nunca deben reutilizarse los pocillos.

9 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado (WASH)

El contenido de cada botella del concentrado de solución de lavado (50x) debe diluirse mediante adición de agua destilada para obtener un volumen final de 1000 mL (1 litro).

Tampón de muestra PD (DILUENT)

Antes de su uso, diluir el contenido (20 mL) del vial de tampón de muestras concentrado 5x con agua destilada o desionizada hasta un volumen final de 100 mL.

10 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Antes de su uso en ensayo diluir las muestras de pacientes **1:100** con tampón de muestra:

Ponga 990 µL de tampón de muestra prediluido en un tubo de poliestireno y se añaden 10 µL de muestra. Agitar bien.

Guarda: Los calibradores / controles se presentan listos para su uso y no deben ser diluidos.

11 PROCEDIMIENTO

Preparar el número de tiras de la microplaca suficiente para disponer los calibradores, controles y muestras prediluidas.

1. Pipetear **100 µL** de calibradores, controles y muestras prediluidas en los pocillos.
2. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
3. Vaciar los pocillos y lavar **3 veces con 300 µL** de solución de lavado.
4. Dispensar **100 µL** de conjugado en cada pocillo
5. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
6. Vaciar los pocillos y lavar **3 veces con 300 µL** de solución de lavado.
7. Dispensar **100 µL** de substrato TMB en cada pocillo
8. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
9. Añadir **100 µL** de solución de paro a todos los pocillos
10. Incubar durante **5 minutos** a temperatura ambiente
11. **Leer la densidad óptica** a 450 nm (referencia 600-690 nm) y calcular los resultados. El color desarrollado en la reacción es estable durante 30 minutos. Leer durante este periodo.

Ejemplo de un esquema de pipeteo:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Muestras A-F Calibrador C+, C- Control

12 VALIDACIÓN

El test se considera válido siempre que la densidad óptica a 450 nm del calibradores y controles y los resultados de los controles se ajuste al rango respectivo indicado en el certificado de análisis incluido en cada kit.

Si no se cumple alguno de los criterios los resultados no se consideran válidos y el ensayo debe repetirse.

13 INTERPRETACION DE RESULTADOS

Para obtener resultados cuantitativos parcela la densidad óptica de cada calibrador frente a la concentración del calibrador para crear una curva de calibración. La concentración de las muestras de pacientes se obtendrá por interpolación en la gráfica así obtenida.

Uso de software de reducción de datos de un 4-parámetros-Fit con coordenadas lin-log de la densidad óptica y la concentración es el método de reducción de datos de la elección.

14 LOS CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO

14.1 Calibrado

El sistema de ensayo está calibrado frente a la preparación de referencia internacional WHO Wo/80 para los anticuerpos human anti-dsDNA IgG como 200 IU/mL.

14.2 Rango de medición

El intervalo de cálculo de este ensayo ELISA es 0 - 200 IU/mL

14.3 Valores previstos

En un estudio habitual del intervalo con muestras de suero de donantes de sangre sanos se han establecido los siguientes intervalos con el ensayo ELISA:

valor límite: 20 IU/mL

14.4 Interpretación de los resultados

Negativa < 20 IU/mL

Positiva ≥ 20 IU/mL

14.5 Linealidad

Se diluyeron en serie muestras de pacientes con niveles altos de anticuerpos en un tampón de muestra para demostrar el intervalo dinámico del ensayo en el límite superior/ inferior de linealidad. Se calculó la actividad para cada dilución a partir de la curva de calibración con un 4-parámetros-Fit con el lin-log coordina.

Muestra	Dilución	Observado [IU/mL]	Esperado [IU/mL]	O/E [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
	1:200	50.6	52.1	97
	1:400	24.9	26.1	95
	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
	1:200	68.9	67.7	102
	1:400	35.2	33.8	104
	1:800	18.2	16.9	108

14.6 Límite de detección

Sensibilidad funcional: 1 IU/mL

14.7 Reproducibilidad

Precisión intranalítica:

se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres (3) muestras a partir de los resultados de 24 análisis en una única serie. En la tabla siguiente se muestran los resultados para la precisión intranalítica.

Precisión entre ensayos:

se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres muestras a partir de los resultados de seis (6) análisis en cinco (5) series diferentes. Los resultados para las precisiones de serie en serie se muestran en la siguiente tabla.

Intra-Ensayo		
Muestra	Medio [IU/mL]	CV [%]
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Inter-Ensayo		
Muestra	Medio [IU/mL]	CV [%]
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

14.8 Interferencias

No se ha observado ninguna interferencia con sueros o plasmas hemolíticos (hasta 1000 mg/dL), lipémicos (hasta 3 g/dL triglicéridos) o ictéricos (hasta 40 mg/dL)

Ni se han observado efectos de interferencia con anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato).

Sin embargo, por razones prácticas, se recomienda evitar muestras altamente hemolizadas o lipemizadas.

14.9 Resultados del estudio

Study population	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human serum	115	1	0.9

		Diagnóstico clínico		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Sensibilidad: 81.2 %
Especificidad: 98.6 %
Eficiencia diagnóstica: 88.6 %

15 LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo es una ayuda diagnóstica. El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una prueba, sino que debe ser realizada por el médico después de todo, los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados respecto a la imagen completa clínica del paciente. También todas las decisiones de tratamiento deben tenerse en cuenta individualmente.

Los rangos de referencia anteriores, deberían considerarse únicamente como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de anticuerpos en muestras de pacientes.

FR

1 DESTINATION

Anti-dsDNA IgG ELISA est un système de test qui permet de déterminer la quantité d'anticorps IgG contre l'ADN ds présents dans le sérum ou le plasma humain.

Ce produit est destiné à être utilisé exclusivement par du personnel qualifié dans le cadre d'un diagnostic in vitro.

Le test est utilisé comme aide au diagnostic différentiel des maladies inflammatoires auto-immunes, en particulier le lupus érythémateux systémique (SLE). Les anticorps contre l'ADN ds sont des marqueurs diagnostiques pour le SLE et les niveaux peuvent être élevés pendant une maladie active. L'évaluation d'un résultat de test doit toujours tenir compte de tous les résultats diagnostiques cliniques et de laboratoire.

2 METHODOLOGIE

Les puits de la plaque de microtitration sont recouverts d'ADNdb hautement purifié (ADNdb). La réaction est basée sur le principe de l'ELISA indirect, avec les étapes suivantes :
des anticorps spécifiques contenus dans l'échantillon à tester se lient aux surfaces recouvertes d'antigènes dans les deux puits de réaction formant un complexe antigènes-anticorps. Après l'incubation, une première étape de nettoyage élimine les molécules non liées et les molécules liées non spécifiées. Le conjugat d'enzyme fourni ajouté par la suite se lie aux complexes antigènes-anticorps qui se forment. Après l'incubation, une seconde étape de nettoyage élimine le conjugat superflu. L'ajout de solution de substrat d'enzyme entraîne l'hydrolisation et le développement des couleurs pendant l'incubation. L'addition d'un acide arrête la réaction formant une couleur jaune produit final.

L'intensité de la couleur jaune varie en fonction de la concentration des complexes antigènes-anticorps et est mesurée à 450 nm par un module optique.

3 PRECAUTIONS D'USAGE

- Tous les réactifs de ce système de test sont conçus pour être utilisés exclusivement par du personnel qualifié dans le cadre du diagnostic in vitro.
- Les composants qui contiennent du sérum humain sont testés pour le HBsAg, HCV, HIV1 et HIV2 à l'aide des méthodes définies par la FDA et les résultats sont négatifs. Etant donné qu'aucun test ne peut garantir l'absence de HBsAg, HCV, HIV1 et HIV2, nous recommandons de manipuler tous les composants du kit contenant du sérum comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- L'albumine de sérum bovin (BSA), contenue dans des composants, est testée pour l'ESB et les résultats sont négatifs.
- Eviter tout contact avec le substrat d'enzyme TMB (3,3´,5,5´-Tétraméthylbenzidine).
- Solution d'arrêt contiennent des acides. Leur concentration n'est pas dangereuse. Eviter tout contact avec la peau.
- Le contrôle, le diluant d'échantillon et la solution de nettoyage contiennent 0.09 % d'acide de sodium comme conservateur. Sa concentration n'est pas dangereuse.
- Le conjugat d'enzyme contient 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur. Sa concentration n'est pas dangereuse.

Lors de la manipulation des réactifs, des contrôles et des échantillons patient, les directives de sécurité en application dans le laboratoire et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées :

- Mesures de premiers secours :
  En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau et au savon. Retirer les vêtements et les chaussures contaminés et les nettoyer avant de les porter. En cas de contact du liquide du système avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de projection dans les yeux, rincer les yeux grand ouverts sous l'eau courante pendant au moins 10 minutes. En cas de besoin, consulter un médecin.
- Mesures en cas de déversement de liquide accidentel :
  respecter les directives de sécurité des bonnes pratiques de laboratoire. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. Ne pas avaler. Ne pas pipetter avec la bouche. Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans des zones de manipulation des échantillons ou des composants du produit. Absorber avec un matériel inerte et mettre au rebut de manière appropriée.
- Equipement de protection personnel :
  porter des gants de protection en nitril ou en latex. Porter des lunettes de protection. Dans le cadre d'une utilisation appropriée, aucun réactif n'est dangereux.
- Conditions spéciales :
  étant donné que le substrat TMB est photosensible, conserver dans un endroit à l'abri de la lumière.
- Les déchets doivent être mis au rebut conformément aux réglementations nationales et locales sur la protection de l'environnement.

Il convient de respecter les directives de contrôle qualité des laboratoires médicaux en matière de manipulation de sérums de contrôle.

4 CONTENU DU COFFRET

Symboles		Suffisant pour 96 déterminations
MICROPLATE	1	Microplaque sécable composée de 12 barrettes de 8 puits. Prêt à l'emploi.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Calibrateur A*** 0 IU/mL, dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Calibrateur B*** 12.5 IU/mL, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Calibrateur C*** 25 IU/mL, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Calibrateur D*** 50 IU/mL, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Calibrateur E*** 100 IU/mL, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Calibrateur F*** 200 IU/mL, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Contrôle positif***, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi. La concentration est indiquée dans le certificat d'analyse.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Contrôle négatif***, avec des anticorps dsDNA dans une matrice sérum/tampon (PBS, BSA, détergent, NaN_3 0.09%). Prêt à l'emploi. La concentration est indiquée dans le certificat d'analyse.
DILUENT	20 mL	***Diluant d'échantillon PD***; jaune; PBS, BSA, détergent ; 0,09 % NaN_3 comme conservateur, concentré (5 x).
CONJUGATE	15 mL	***Conjugat d'enzyme***; rouge clair; contient des anticorps anti-humains I**gG** avec marquage à la péroxidase, PBS, BSA, détergent; 0.05 % de Proclin comme conservateur.
TMB	15 mL	***Solution de substrat TMB***; contient 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine. Prêt à l'emploi.
STOP	15 mL	***Solution d'arrêt***; contient acide. Prêt à l'emploi.
WASH	20 mL	***Tampon de lavage***; contient tampon Tris, détergent, 0.09 % comme conservateur, concentré (50 x).
	1	Instructions d'utilisation
	1	Certificat d'analyse

5 MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Lecteur de microplaque pouvant réaliser des mesures en point final à 450 nm; 620 nm de référence facultatif
- Logiciel d'exploitation des données
- Micropipettes avec des seringues à usage unique pour 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Agitateur Vortex
- Pipettes de 10 µL, 100 µL et 1000 µL
- Minuterie
- Eau distillée ou désionisée
- Eprouvette graduée de 100 et 1000 mL
- Récipient plastique pour le stockage de la solution de lavage

Automation
Ce test ELISA peut être utilisé sur les processeurs ELISA ouverts automatisés. La demande doit être validée sur le système automatisé respective. L'information est fournie sur demande.

6 OBTENTION, STOCKAGE ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

- Les prélèvements de sang doivent être effectués conformément aux directives et aux procédés en vigueur.
- Laisser coaguler le sang et extraire le sérum par centrifugation.
- L'utilisation de sérums hèmolytisés, lipémiques et ictériques doit être évitée.
- Les prélèvements de sérum et de plasma peuvent être conservés jusqu'à 5 jours au frais à une température entre 2 °C - 8 °C. Si un stockage prolongé est envisagé, les prélèvements devraient être aliquotés et congelés à une température de -20 °C.
- Eviter des décongélations et des congélations répétées! Ceci peut avoir pour résultat une perte variable d'activité des auto-anticorps ou des anticorps.
- L'utilisation de sérums inactivés par la chaleur n'est pas recommandée.

7 STOCKAGE ET STABILITE

- Stockage du kit de test entre 2 °C - 8 °C à l'abri de la lumière.
- Ne pas exposer les réactifs à la chaleur, au soleil ou à une lumière forte pendant leur stockage et leur utilisation.
- Conserver microplaque dans le sachet refermable fourni avec le dessicatif.
- Le produit peut être conservé pendant 18 mois à partir du jour de sa production s'il n'est pas ouvert. Les réactifs qui ne sont pas ouverts restent stables jusqu'à la date d'expiration du produit. Se reporter à l'étiquette de chaque lot.
- La solution de nettoyage et le diluant d'échantillon dilués restent stables pendant au moins 30 jours, entre 2 °C - 8 °C. Nous recommandons d'utiliser en une journée.

8 RECOMMANDATIONS

- Le kit d'analyse ne peut pas être utilisé après la date de péremption.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de trousses de lots différents et produits.
- Utiliser les réactifs à température ambiante (20 °C - 28 °C).
- Préparer les échantillons et les réactifs. Une fois le test est commencé, réalisée sans interruption.
- Double déterminations peut être fait. Par ce moyen erreurs de pipetage peut devenir évident
- Respecter strictement l'ordre des étapes.
- Toujours utiliser des dilutions d'échantillons fraîchement préparées.
- Pipeter tous les réactifs et échantillons dans le fond des puits.
- Pour éviter les contaminations croisées, changer d'embout entre chaque échantillon, contrôle, calibrateur.
- Laver soigneusement micropuits et enlever les gouttelettes derniers de tampon de lavage.
- Toutes les étapes d'incubation doivent être minutées précisément.
- Ne pas réutiliser les puits d'une microplaque.

9 PREPARATION DES REACTIFS

Tampon de lavage (WASH)

Le contenu de chaque bouteille de concentré de solution tampon de lavage (20 mL) doit être dilué - avant l'utilisation – par l'ajout d'eau distillée jusqu'à un volume final de 1000 mL (1 litre).

Diluant d'échantillon PD (DILUENT)

Diluer le contenu (20 mL) de chaque flacon de concentré (5x) de tampon de dilution des échantillons avec de l'eau distillée ou désionisée, pour obtenir un volume final de 100 mL.

10 ECHANTILLONS PATIENT

Avant d'utiliser d'essai diluer tous les échantillons des patients à **1:100** avec le tampon d'échantillon:

Mettez 990 µL de tampon d'échantillon dilué dans un tube en polystyrène et ajouter 10 µL de l'échantillon. Mélangez bien.

Renseignement : Les contrôles et calibrateurs sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.

11 MODE OPERATOIRE

Préparer un nombre de barrettes suffisant pour tous les contrôles et échantillons dilués.

1. Distribuer **100 µL** de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dilués dans les puits.
2. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante (20-28°C)
3. Aspirer le contenu des puits et **laver 3 fois** avec **300 µL** de solution de lavage.
4. Distribuer **100 µL** de conjugué dans chaque puits.
5. Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.
6. Aspirer le contenu des puits et **laver 3 fois** avec **300 µL** de solution de lavage.
7. Distribuer **100 µL** de TMB dans chaque puits.
8. Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.
9. Ajouter **100 µL** de solution d'arrêt dans chaque puits
10. Incuber **5 minutes** à température ambiante.
11. Lire la densité optique à 450 nm (référence 600-690 nm) et calculer les résultats.
    La couleur obtenue est stable pendant au moins 30 minutes. Lire pendant ce laps de temps.

Exemple pour un schéma de pipetage:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Échantillons, A-F Calibrateur, C+, C- Control

12 VALIDATION

Le test est validé uniquement si la densité optique à 450 nm pour contrôles et étalons et les résultats en lecture pour les contrôles conformer à des valeurs de référence indiquée sur le certificat d'analyse inclus dans chaque kit de test.

Si ces critères de contrôle de qualité ne sont pas respectées la série de tests est invalide et doit être répété.

13 RESULTATS

Pour obtenir des données quantitatives porter les densités optiques moyennes de chaque calibrateur en fonction de la concentration. La concentration des échantillons de spécimens peuvent alors être estimée à partir de la courbe d'étalonnage par interpolation.

Logiciel de traitement de données avec ajustement de la courbe à 4 paramètres et lin-log coordonnées de la densité optique et la concentration est la meilleure méthode.

14 PERFORMANCES DE LA TROUSSE

14.1 Calibration

Le système de dosage est calibré par rapport à la préparation de référence internationale l´OMS Wo/80 pour les anticorps human anti-dsDNA IgG de 200 IU/ml.

14.2 Gamme de mesure

La plage de mesure est de 0 - 200 IU/mL

14.3 Valeur normale

Dans le cadre d'une étude de la plage normale avec des échantillons de donneurs de sang sains, les valeurs suivantes ont été définies :

Valeur limite : 20 IU/mL

14.4 Interprétation des résultats

Négatif: < 20 IU/mL

Positif: ≥ 20 IU/mL

14.5 Linéarité

Échantillons patient présentant une concentration d'anticorps spécifique plus élevée sont dilués de manière linéaire dans la solution de dilution, pour représenter la zone dynamique de l'échantillon, ainsi que les limites inférieure et supérieure de la linéarité. L'activité des anticorps de chaque étape de dilution a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant un 4-Parameter-Fit avec lin-log coordonne.

Echantillon	Dilution	Observé [IU/mL]	Escompté [IU/mL]	O/E [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
	1:200	50.6	52.1	97
	1:400	24.9	26.1	95
	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
	1:200	68.9	67.7	102
	1:400	35.2	33.8	104
	1:800	18.2	16.9	108

14.6 Limite de détection

Sensibilité functional: 1 IU/mL

14.7 Données techniques

Précision intra-test:
le coefficient de variation (CV) est calculé pour trois échantillons à partir de 24 réalisés en un seul dosage. Les résultats de la précision intra-test sont récapitulés dans le tableau.

Précision inter-test:
le coefficient de variation (CV) est calculé pour trois échantillons à partir de 6 réalisées en 5 dosages. Les résultats de la précision inter-test sont récapitulés dans le tableau.

Intra-test		
Echantillon	Moyenne [IU/mL]	CV [%]
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Inter-test		
Echantillon	Moyenne [IU/mL]	CV [%]
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

14.8 Interférences

Aucune interférence n'a été observée avec les sérums hémolytiques (max. 1000 mg/dL), lipémiques (max. 3 g/dL triglycérides) ou la billirubine (max. 40 mg/dL).

De même aucune interférence avec les anticoagulants (l'EDTA, l'héparine, le citrate) n'a été constatée.

Cependant, pour des raisons pratiques, il est recommandé d’éviter l’utilisation d’échantillons hémolysés ou lipémiques

14.9 Résultats d'étude

Population étudiée	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human serum	115	1	0.9

		Diagnostic clinique		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Sensibilité:	81.2 %
Spécificité:	98.6 %
Efficacité diagnostique:	88.6 %

15 LIMITES DU PROCEDE

Ce test est une aide au diagnostic. Un diagnostic clinique ne doit pas être basé sur le résultats d´un seul test, mais doit être fait par un médecin après évaluation de l´ensemble des résultats laboratoire et des éléments cliniques, entenant compte de toute la clinique du patient. De plus, chaque décision de traitement doit être prise individuellement.

Les plages de référence ci-dessus pathologiques et normaux d'anticorps dans les échantillons des patients doivent être considérés que comme des recommandations. Chaque laboratoire doit fondée ses propres gammes en fonction de la norme ISO 15189 ou d'autres lignes directrices applicables en laboratoire.

PT

1 FINALIDADE PREVISTA

O Anti-dsDNA IgG ELISA é um teste de ELISA destinado a quantificação de autoanticorpos IgG contra a dsDNA em soro e plasma humanos.

Este produto é destinado exclusivamente para uso profissional no diagnóstico in vitro.

O teste é usado como ajuda no diagnóstico diferencial de doenças autoimunes inflamatórias, em especial lúpus eritematoso sistémico (LES). Os autoanticorpos anti-DNA são marcadores de diagnóstico para LES e, com a doença ativa, os níveis podem ser elevados. A avaliação dos resultados do teste deve ter sempre em consideração todos os resultados dos diagnósticos clínicos e laboratoriais.

2 METODOLOGIA

Os poços da placa de microtítulo são revestidos com dsDNA altamente purificado (dsDNA). A determinação é baseada numa reacção imune indirecta associada à enzima com as seguintes fases:
Os anticorpos, presentes nas amostras, reagem com os antigénios que revestem a superfície do poço, formando um complexo antigénio-anticorpo. Após incubação, uma primeira fase de lavagem remove as moléculas que não se ligaram, existentes no soro e no plasma. O conjugado, anticorpo anti-humano conjugado com Horseradish peroxidase (HRP), liga-se ao anticorpo da amostra, formando-se um complexo antigénio-anticorpo-conjugado.

Após a incubação, uma segunda fase de lavagem remove o conjugado de enzima não ligado. Com a adição de uma solução de substrato de enzima, ocorre uma reação de hidrolização e desenvolvimento de uma cor azul durante a incubação. A adição de um ácido pára a reação, formando um produto final de cor amarelo.

A intensidade da cor amarela tem uma correlação com a concentração do complexo antigénio-anticorpo, podendo ser medida fotometricamente a 450 nm.

3 AVISOS E PRECAUÇÕES

- Todos os reagentes desta embalagem de teste devem ser exclusivamente usados por profissionais especializados no diagnóstico in vitro.
- Os componentes contendo soro humano foram testados através de metidos reconhecidos pela FDA, com resultados negativos para HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2. Nenhum teste pode garantir a ausência de HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2. No entanto, é recomendado que todos os reagentes deste kit, contendo soro humano, sejam manuseados como se pudessem transmitir infeções.
- Albumina de soro de bovino (BSA), presente nos reagentes, foi testada quanto a BSE e considerada negativa.
- Evitar o contato com o substrato enzimático TMB (3,3´,5,5´-Tetrametilbenzidina).
- Solução de paragem contém ácido. Esta concentração não está classificada como sendo perigosa. Evitar contato com a pele.
- O controlo, tampão de amostra e tampão de lavagem contêm azida de sódio 0.09% como conservante. Esta concentração não está classificada como sendo perigosa.
- O conjugado enzimático contém 0.05% ProClin 300 como conservante. Esta concentração não está classificada como sendo perigosa.

No manuseio dos reagentes, controlos e amostras dos pacientes, considerar que todas as diretivas preventivas e boas práticas de laboratório sejam cumpridas:

- Medidas de primeiros-socorros:
  Em caso de contato com a pele lavar imediatamente com água limpa e sabão. O vestuário e calçados contaminados devem ser lavados a antes da sua reutilização. Caso o líquido do sistema entrar em contato com a pele, lavar abundantemente com água. Caso ocorra o contato com os olhos, estes devem ser lavados com água abundante e corrente, durante no mínimo 10 minutos. Caso necessário consultar um médico.
- Medidas de prevenção de segurança:
  Observar as diretivas de segurança de boas práticas de laboratório. Evitar contato com a pele e com os olhos. Não pipetar com a boca. Não comer, beber, fumar ou maquilhar-se nas zonas de manuseio das amostras ou componentes do produto. Limpar os produtos vertidos com material absorvente e eliminar no lixo apropriado.
- Medidas e equipamentos de proteção pessoal:
  Usar luvas de nitrilo ou de latex. Usar óculos de proteção. Em caso de utilização apropriada não são conhecidas nenhumas reacções perigosas.
- Condições a serem evitadas:
  Como o substrato TMB é sensível à luz, prevenir exposições prolongada. O frasco deve ser armazenado em espaços escuros.
- Os resíduos devem ser eliminados de acordo com os regulamentos ambientais nacionais.

Consultar as diretivas do controlo da qualidade no laboratório médico relativamente ao uso de soros de controlo.

4 CONTEÚDO DO KIT

Símbolos		Suficiente para 96 determinações
MICROPLATE	1	Uma microplaca é constituída por 12 tiras de 8 poços. Pronto a usar .
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Calibrador A*** 0 IU/mL, contendo matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Calibrador B*** 12.5 IU/mL, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Calibrador C*** 25 IU/mL, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Calibrador D*** 50 IU/mL, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Calibrador E*** 100 IU/mL, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Calibrador F*** 200 IU/mL, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Controlo positivo***, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar. A concentração encontra-se especificada no certificado de análise que acompanha o produto.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Controlo negativo***, contendo anticorpos dsDNA numa matriz de soro/tampão (PBS, BSA, detergente, NaN_3 0.09%). Pronto para usar. A concentração encontra-se especificada no certificado de análise que acompanha o produto.
DILUENT	20 mL	***Tampão de amostra PD***, amarelo; contendo PBS, BSA, detergentes; NaN_3 0.09% como conservante; 5x concentrado..
CONJUGATE	15 mL	***Conjugado enzimático***; vermelho claro; contendo anticorpos de IgG anti-humanos marcados com HRP; PBS, BSA, detergentes; 0.05% Proclin como conservante. Pronto a usar.
TMB	15 mL	***Solução de substrato****;* contendo TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). Pronto a usar.
STOP	15 mL	***Solução de paragem***; contendo ácido. Pronto a usar.
WASH	20 mL	***Tampão de lavagem***; contendo Tris, detergente, NaN_3 0.09% como conservante; 50x concentrado.
	1	Instruções de utilização
	1	Certificado de análise

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Leitor de microplacas com um filtro óptico de 450 nm; opcional: filtro óptico de 620 nm
- Software de redução de dados
- Dispensador Multi-canal ou pipeta de repetição para 100 µL
- Agitador de tubos (tipo Vortex)
- Micropipetas com pontas descartáveis para 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Relógio de Laboratório
- Água destilada ou desionizada
- Cilindro de medição para 1000 mL, 100 mL
- Frasco de plástico (esguicho) para a solução de lavagem

Automação
Este ensaio de ELISA pode ser utilizado em sistemas automáticos abertos de ELISA. Cada ensaio deve ser validado no respetivo sistema automático. A informação é fornecida mediante solicitação.

6 COLETA DA AMOSTRA, ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO

- As amostras de sangue devem ser recolhidas em conformidade com as diretivas e processos aplicáveis para evitar hemólise.
- Deixar o sangue coagular e obter o soro ou plasma através de centrifugação.
- Evitar o uso de soros hemolíticos ou lipémicos, apesar de não interferir com o ensaio.
- As amostras de soro e de plasma podem ser guardadas até cinco dias, a uma temperatura entre 2 °C - 8 °C. Caso necessário, poderá ser armazenada a -20 °C até seis meses.
- Evitar ciclos de congelação e descongelação da amostra, para prevenir a perdas de atividade do autoanticorpo ou anticorpo.
- Não é recomendável a utilização de soros inativados pelo calor.

7 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

- Armazenamento da embalagem de teste a 2 °C - 8 °C em espaço escuro.
- Durante a utilização ou armazenamento, não expor os reagentes ao calor, sol ou fonte de incidência de luz forte.
- Armazenar microplaca selada no saco fornecido com o secante.
- O tempo de validade, da embalagem do teste fechada, é de 18 meses a partir do dia de produção. Os reagentes fechados estão estáveis até à data de validade da embalagem de teste. Ver etiqueta dos lotes individuais.
- O tampão de lavagem e o tampão de amostra, diluídos, estão estáveis até 30 dias quando armazenados a 2 °C - 8 °C. Recomendamos a utilização da solução preparada no mesmo dia.

8 NOTAS DE PROCEDIMENTO

- Não utilizar os componentes do kit após expirar o prazo de validade.
- Não utilizar componentes de kits de lotes diferentes e produtos.
- Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (20 °C - 28 °C) antes de usar.
- Preparar todos os regentes e amostras. Uma vez iniciado o teste, este deverá ser conduzido sem interrupções.
- Determinações em duplicado poderão ser efectuadas. Por conseguinte, poderão ocorrer erros de pipetagem.
- Executar os passos do teste pela ordem indicada no protocolo.
- Usar sempre amostras diluídas frescas.
- Pipetar todos os reagentes e amostras no fundo dos poços.
- Para evitar contaminação substituir as pontas das micropipetas entre pipetagens de amostras e de diferentes controlos.
- É importante lavar os micropoços cuidadosamente e remover restos de solução de lavagem.
- Todos os passos da incubação deverão ser corretamente cronometrados.
- Não reutilizar poços das microplacas.

9 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem (WASH)

Antes da utilização, diluir o conteúdo do frasco concentrado (50x) com água destilada ou desionizada para um volume final de 1000 mL.
(Sugestão: pipetar 20 mL de solução concentrada e perfazer com 980 mL de água destilada).

Tampão de amostra PD (DILUENT)

Antes de usar, diluir o conteúdo (20 mL) de cada frasco de tampão de amostra concentrada (5x) com água destilada até a um volume final de 100 mL.

10 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Antes de iniciar o teste, fazer uma diluição das amostras de **1:100** com tampão de amostras:

Colocar 990 µL de tampão de amostra pré-diluída num tubo de poliestireno e adicionar 10 µL de amostra. Misturar bem.

Nota: Calibradores / controlos estão prontos para usar e não precisam ser diluídos.

11 EXECUÇÃO DO TESTE

Preparar o número de tiras necessárias para os calibradores, soros controlo e amostras pré-diluídas.

1. Pipetar **100 µL** de calibradores, soros controlo e amostras pré-diluídas nos poços.
2. Incubar durante **30 minutos** à temperatura ambiente (20 °C - 28 °C)
3. Deitar fora o conteúdo dos poços e **lavar 3 vezes** com **300 µL** de solução de lavagem.
4. Pipetar **100 µL** do conjugado em cada poço.
5. Incubar **15 minutos** à temperatura ambiente.
6. Deitar fora o conteúdo dos poços e **lavar 3 vezes** com **300 µL** de solução de lavagem.
7. Pipetar **100 µL** de solução de TMB em cada poço.
8. Incubar **15 minutos** à temperatura ambiente.
9. Adicionar **100 µL** de solução de paragem (stop solution) a cada poço.
10. Incubar (sem agitação) 5 minutos à temperatura ambiente.
11. Ler a densidade ótica a 450 nm e calcular os resultados.
    A coloração obtida mantém-se estável por 30 minutos. Ler durante este período de tempo.o.

Exemplo de um esquema de pipetagem:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Amostras, A-F Calibrador, C+, C- Controlo

12 VALIDAÇÃO

O resultado do teste é considerado válido apenas se a densidade ótica a 450 nm, para calibradores / controlos, estiver de acordo com os valores de referência respetivos, indicados no certificado de análise incluídos no kit.

Se algum destes valores não coincidir, os resultados deverão ser considerados inválidos e o teste deverá ser repetido.

13 CÁLCULO DOS RESULTADOS

Para a análise de resultados quantitativos, criar uma curva de calibração com a densidade ótica do calibrador versus concentração do calibrador. A concentração das amostras dos pacientes pode, então ser calculada, a partir da curva de calibração, por interpolação.

Utilizando um software de redução de dados, aplicar uma coordenada 4-Parameter Fit com lin-log para a densidade ótica e concentração (Curva de regressão linear).

14 VALORES DE REFERÊNCIA

14.1 Calibração

O sistema de ensaio é calibrado com a preparação de referência internacional WHO Wo/80 para os anticorpos human anti-dsDNA IgG como 200 IU/mL.

14.2 Amplitude de medição

O cálculo dos limites do ensaio de ELISA é 0 - 200 IU/mL

14.3 Valores normais

No âmbito de um estudo de intervalo de referência com amostras de dadores de sangue saudáveis foram determinados os seguintes valores para este ensaio de ELISA:

Cut-off: 20 IU/mL

14.4 Interpretação dos resultados

Negativo: < 20 IU/mL

Positivo: ≥ 20 IU/mL

14.5 Linearidade

As amostras de pacientes, com elevada concentração de anticorpos específicos, foram diluídas em série em tampão de amostra para demonstrar o intervalo dinâmico do ensaio e o limite superior e inferior de linearidade. A atividade dos anticorpos de cada diluição foi calculada a partir da curva de calibração, utilizando a coordenada 4-Parâmetro Fit com lin-log (Curva de regressão linear).

Amostra	Diluição	Observado [IU/mL]	Esperado [IU/mL]	O/E [%]
1	1:100	104.2	104.2	100
	1:200	50.6	52.1	97
	1:400	24.9	26.1	95
	1:800	11.2	13.0	86
2	1:100	135.3	135.3	100
	1:200	68.9	67.7	102
	1:400	35.2	33.8	104
	1:800	18.2	16.9	108

14.6 Limite de detecção

A sensibilidade functional foi determinada para ser: 1 IU/mL

14.7 Dados Técnicos

Precisão Intra-Ensaio:

O coeficiente de variação (CV) foi calculado para cada três amostras a partir dos resultados de 24 determinações num único ensaio. Os resultados da precisão intra-ensaio estão resumidos na tabela abaixo.

Precisão Inter-Assay:

O coeficiente de variação (CV) foi calculado para cada três amostras a partir dos resultados de 6 determinações em 5 ensaios. Os resultados da precisão de cada ensaio estão resumidos na tabela abaixo.

Intra-análise		
Amostra	Recurso [IU/mL]	CV [%]
1	26.0	4.5
2	61.0	3.1
3	114.0	6.4

Interanálise		
Amostra	Recurso [IU/mL]	CV [%]
1	29.0	12.4
2	68.0	7.3
3	138.0	5.2

14.8 Interferências

Não foi observada qualquer interferência com soros ou plasmas hemolíticos (até 1000 mg/dL) ou lipémicos (até 3g/dL de triglicéridos) ou com bilirrubina (até 40 mg/dL) contendo soro ou plasma.

Também não foram observados quaisquer efeitos interferentes com a utilização de anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato de sódio).

Contudo, por razões práticas, é recomendado evitar amostras demasiado hemolizadas ou lipémicas.

14.9 Resultados de estudo

População de estudo	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human serum	115	1	0.9

		Diagnóstico clínico		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Sensibilidade: 81.2 %
Especificidade: 98.6 %
Eficiência diagnóstica: 88.6 %

15 LIMITES DO PROCESSO

Este teste é um auxiliar de diagnóstico. Um diagnóstico clínico definitivo não deve ser baseada nos resultados de um teste único, mas deve ser feita pelo médico depois de tudo dados clínicos e laboratoriais foram avaliadas em relação à imagem inteira clínica do paciente. Também todas as decisões para a terapia deve ser tomada individualmente.

Os intervalos de referência acima patológicas e normais de anticorpos nas amostras dos pacientes deve ser considerada como apenas recomendações. Cada laboratório deve estabelecer suas próprias faixas de acordo com a ISO 15189 ou outras diretrizes de laboratório aplicáveis.

CS

1 URČENÝM ÚČELEM

Anti-dsDNA IgG je testovací systém ELISA pro kvantitativní měření IgG tříd protilátek proti dsDNA ve vzorcích lidského séra nebo plasmy.

Tento product je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

Zkouška se používá jako pomocná metoda v diferenciální diagnostice zánětlivých autoimunitních onemocnění, zejména systémového lupusu erythematodes (SLE). Protilátky proti dsDNA představují diagnostické markery pro SLE. Jejich hladiny mohou být zvýšeny během aktivní fáze onemocnění. Při hodnocení výsledku zkoušky je třeba vždy přihlédnout ke všem klinickým a laboratorním diagnostickým nálezům.

2 PRINCIP TESTU

Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy vysoce přečištěnou dsDNA (dsDNA). Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se navážou na antigen nanesený na povrch reakčních jamek a vytvoří komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidaný enzymatický konjugát se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolýze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Přídavek kyseliny zastaví reakci, které tvoří žlutý finální produkt. Intenzita žlutého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 450 nm.

3 UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Komponenty obsahující lidské sérum byly otestovány a nebyly nalezeny HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 dle schválených metod FDA. Žádný test nemůže zaručit absenci HBsAg, HCV, HIV1 nebo HIV2 a je tedy nutno s každým lidským sérem, obsahujícím látky testu, manipulovat jako s infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhněte se kontaktu se substrátem TMB (3,3´,5,5´-tetrametyl benzidin).
- Ukončovací roztok obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc:
  V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchnete důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně oplachujte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze:
  Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepije, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a politý materiál řádně zlikvidujte.
- Limity vystavení / ochrana osob:
  Noste ochranné rukavice z nitridové pryže nebo přirozeného latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.
- Situace, kterým je třeba předcházet:
  Roztok substrátu je citlivý na světlo. Skladujte na tmavém místě.
- Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.

Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami séry.

4 OBSAH SOUPRAVY

Symboli		Dostačuje pro 96 stanovení
MICROPLATE	1	Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Kalibrátor A*** 0 IU/mL, obsahující séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Kalibrátor B*** 12.5 IU/mL, obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Kalibrátor C*** 25 IU/mL, obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Kalibrátor D*** 50 IU/mL, obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Kalibrátor E*** 100 IU/mL, obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Kalibrátor F*** 200 IU/mL, obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Kontrola pozitivní,*** obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Kontrola negativní***, obsahující dsDNA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN_3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
DILUENT	20 mL	***Vzorkový pufr PD***; žlutá; obsahuje PBS, BSA, saponáty, ochranný prostředek azid sodný 0.09%, 5x koncentrát.
CONJUGATE	15 mL	***Enzymový konjugát***; světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek Proclin 0,05%
TMB	15 mL	***TMB substrátový roztok***; 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidin. Připraveno k použití.
STOP	15 mL	***Ukončovací roztok***; obsahuje kyselinu. Připraveno k použití.
WASH	20 mL	***Promývací pufr***; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát.
	1	Návod k použití
	1	Certifikát analýzy

5 POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Reader – čtečka mikrotitračních desek schopná koncových měření při 450 nm; volitelně 620 nm referenční vlnové délky
- software pro redukci dat
- vícekanálový dávkovač nebo pipeta pro opakované dávkování o obsahu 100 µL
- mixér Vortex
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- laboratorní stopky
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 mL, 100 mL
- plastová nádoba pro skladování promývacího roztoku

Automatizace
ELISA sety lze použit na otevřených automatických procesorů ELISA. Každý test musí být validní na příslušném automatizovaném systému. Informace jsou k dispozici na vyžádání.

6 ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Krevní vzorky odebírat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat srazit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolitických, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 °C - 8 °C chlazené vzorky séra a plazmy mohou být skladovány až 5 dní. Je-li plánováno delší skladování, měly by být vzorky rozděleny na alikvotní části a při -20 °C hluboce zmrazeny.
- Vyhýbat se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést k variabilní ztrátě aktivity autoprotilátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

7 SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2 °C - 8 °C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte mikrotitrační hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřenésoupravy je 18 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální šarži.
- Rozředěný mycí roztok a vzorkový pufr jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2 °C - 8 °C. Doporučujeme spotřebovat stejný den.

8 POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Složky soupravy nepoužívejte po uplynutí doby trvanlivosti.
- Nezamněňujte jednotlivé součásti souprav z různých šarží a produkty.
- Všechny složky musejí mít pokojovou teplotu (20 °C - 28 °C).
- Připravte si všechny složky a vzorky. Jakmile test začne, je nutné provést celý bez přerušení.
- Dvojité kontroly mohou být provedeny. Tímto způsobem chyby pipetování mohou být více zřejmé.
- Provádějte jednotlivé kroky testu výhradně v určeném pořadí.
- Vždy používejte čerstvě naředěné vzorky.
- Pipetujte veškeré složky a vzorky na dna jamek.
- Aby nedocházelo ke kontaminaci, vyměňujte špičku mezi jednotlivými vzorky a kontrolami soupravy.
- Dosažení nejlepších výsledků je podmíněno důkladným vymytím titračních jamek a důkladným odstraněním promývacího pufru.
- Všechny kroky inkubace musejí být přesně časovány.
- Mikrotitrační destičku nepoužívejte opakovaně.

9 PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací pufr (WASH)

Nařeďte obsah promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000 mL (1 L).

Vzorkový pufr PD (DILUENT)

Před použitím, nařeďte obsah (20 mL) lahvičky koncentrovaného vzorkového pufru 5x destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 100 mL.

10 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Před použitím naředěnďte vzorků od pacientů **1:100** se vzorku pufru:

Přidejte 990 µL předřeďeného vzorkového pufru ve zkumavce a přidejte 10 µL vzorku.

Dobře promíchejte. Kontrolní vzorky a kalibrátory jsou připraveny k použití a není třeba je ředit.

11 TESTU PRECEDURE

Připravte si dostatečný počet mikrotitračních modulů pro všechny kontrolních vzorky a ředěné vzorky.

1. Napipetujte do jamek po **100 µL** kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a ředěných vzorků pacientů.
2. Inkubujte po dobu **30 minut** při pokojové teplotě (20 °C - 28 °C).
3. Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí **300 µL** promývacího roztoku.
4. Do každé jamky přidejte **100 µL** enzymového konjugátu.
5. Inkubujte po dobu **15 minut** při pokojové teplotě.
6. Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí **300 µL** promývacího roztoku.
7. Do každé jamky přidejte **100 µL** roztoku TMB substrátu.
8. Inkubujte po dobu **15 minut** při pokojové teplotě.
9. Do každé jamky přidejte **100 µL** ukončovacího roztoku
10. Inkubujte po dobu **5 minut** při pokojové teplotě.
11. Odečtěte optickou densitu při vlnové délce 450 nm (referenční 600 - 690 nm) a vypočtěte výsledky. Vzniklá barva je stabilní minimálně po dobu 30 minut. Během této doby odečtěte optické densitu.

Příklad pro pipetovací schéma:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Vzorky, A-F Kalibrátor, C+, C- Kontrola

12 VALIDACE

Tento test je platný, pouze pokud optická densita při vlnové délce 450 nm pro kalibrátory / kontroly a výsledky kontrol odpovídá příslušným rozsahům hodnot uvedených v osvědčení o analýze přiloženém u každé testovací soupravy.

Pokud kterékoli z těchto kritérií není splněno, jsou výsledky neplatné a test je nutno opakovat.

13 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro kvantitativní výsledky proložte optickou hustotu každého kalibrátoru versus kalibrační koncentrace a vytvořte kalibrační křivku. Koncentrace neznámých sér lze pak odhadnout interpolací kalibrační křivky.

Software pro zpracování dat se 4-parametrovou křivkou padnou a lin-log souřadnice optické density a koncentrace je nejlepší metoda.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Kalibrace

Test Systém je kalibrován proti mezinárodní referenční přípravy WHO Wo/80 human anti-dsDNA IgG protilátek jako 200 IU/mL.

14.2 Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy ELISA je 0 - 200 IU/mL

14.3 Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků sér dárců zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomocí analýzy ELISA:

Cut-off: 20 IU/mL

14.4 Interpretace výsledků

negativní: < 20 IU/mL

pozitivní: ≥ 20 IU/mL

14.5 Linearita

Vzorky pacientů obsahující vysokou hladinu určité protilátky byly sériově zředěny ve vzorkovém roztoku pro ukázku dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity. Aktivita pro každý roztok byla spočítána z kalibrační křivky pomocí 4-Fit s parametrem-lin-log souřadnicích.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná [IU/mL]	Očekávaná [IU/mL]	P/O [%]
1	1:100	104,2	104,2	100
	1:200	50,6	52,1	97
	1:400	24,9	26,1	95
	1:800	11,2	13,0	86
2	1:100	135,3	135,3	100
	1:200	68,9	67,7	102
	1:400	35,2	33,8	104
	1:800	18,2	16,9	108

14.6 Limit detekce

Funkční citlivost: 1 IU/mL

14.7 Technické údaje

Intraanalyzační přesnost:

Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezů v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalyzační přesnost:

Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 nálezů při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr [IU/mL]	CV [%]
1	26,0	4,5
2	61,0	3,1
3	114,0	6,4

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr [IU/mL]	CV [%]
1	29,0	12,4
2	68,0	7,3
3	138,0	5,2

14.8 Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dL), lipemická (až do 3g/dL triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dL).

Taktéž nebyly pozorovány žádné efekty interference s použitím antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

14.9 Výsledky studie

Study population	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81,2
Other autoimmune diseases	33	1	3,0
Normal human sera	115	1	0,9

		Klinická diagnóza		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

senitivität:	81,2 %
specificita:	98,6 %
diagnostická efektivita:	88,6 %

15 HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měly by být hodnoceny lékařem po všech klinických a laboratorních testech a porovnány s celkovým klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.

Výše patologické a normální referenční rozmezí pro protilátek u vzorků pacientů je třeba považovat za doporučení pouze. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí podle normy ISO 15189 nebo jiné použitelné laboratory pokyny.

EL

1 ΠΡΟΒΛΕΠΌΜΕΝΗ ΧΡΉΣΗ

Anti-dsDNA IgG ELISA είναι σύστημα δοκιμής ELISA για την ποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgG κατά dsDNA στον ανθρώπινο ορό ή το πλάσμα.

Το προϊόν αυτό προορίζεται αποκλειστικά για επαγγελματική χρήση, από εξειδικευμένο προσωπικό, στη διάγνωση in vitro.

Η δοκιμασία χρησιμοποιείται ως βοήθημα στη διαφορική διάγνωση φλεγμονωδών αυτοάνοσων νόσων, ιδιαίτερα του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (SLE). Τα αντισώματα έναντι διπλής έλικας DNA (dsDNA) είναι διαγνωστικοί δείκτες για SLE και τα επίπεδά τους ενδέχεται να αυξηθούν κατά τη διάρκεια ενεργής νόσου. Η αξιολόγηση του αποτελέσματος της δοκιμασίας θα πρέπει πάντα να λαμβάνει υπόψη όλα τα κλινικά και εργαστηριακά διαγνωστικά ευρήματα.

2 ΜΕΘΟΔΟΣ

Τα τρυβλία της πλάκας μικροτιτλοδότησης επικαλύπτονται με dsDNA υψηλής καθαρότητας (dsDNA). Ο προσδιορισμός βασίζεται σε μια έμμεση ανοσολογική αντίδραση συνδεδεμένη με ένζυμο με τα ακόλουθα βήματα:

Τα αντισώματα που υπάρχουν στους θετικούς μάρτυρες δεσμεύονται στο αντιγόνο που είναι επικαλυμμένο στην επιφάνεια των δύο κοιλοτήτων αντίδρασης και δημιουργούν ένα σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου. Έπειτα από την επώαση, ένα πρώτο βήμα πλύσης απομακρύνει τα μη δεσμευμένα και μη ειδικά δεσμευμένα μόρια. Στη συνέχεια, προστίθεται το συζυγές ένζυμο το οποίο δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου. Έπειτα από την επώαση, ένα δεύτερο βήμα πλύσης απομακρύνει το μη δεσμευμένο συζυγές ένζυμο. Η προσθήκη του διαλύματος του υποστρώματος του ενζύμου έχει σαν αποτέλεσμα την υδρόλυση και την ανάπτυξη χρώματος κατά την επώαση. Η προσθήκη οξέος σταματά την αντίδραση σχηματίζοντας ένα κίτρινο τελικό προϊόν.

Η ένταση του κίτρινο χρώματος συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου και μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά στα 450 nm.

3 ΥΠΟΔΕΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Ολα τα αντιδραστήρια της παρούσας συσκευασίας προορίζονται αποκλειστικά για την χρήση από εξειδικευμένο προσωπικό στη διάγνωση in vitro.
- Τα στοιχεία που περιέχουν ανθρώπινο ορό έχουν εξεταστεί και βρεθεί αρνητικά κατά HBsAg, HCV, HIV1 και HIV2 από τις εγκεκριμένες μεθόδους του FDA. Δεδομένου ότι καμία μέθοδος ελέγχου δεν μπορεί να εγγυηθεί την απουσία HBsAg, HCV, HIV1 και HIV2, συνιστάται να χειρίζεστε όλα τα στοιχεία της συσκευασίας, που περιέχουν ορό, ως εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.
- Η αλβουμίνη ορού βοός (BSA) που περιέχεται στα στοιχεία, ελέγχθηκε ως προς τη νόσο BSE και τα αποτελέσματα κρίθηκαν αρνητικά.
- Αποφύγετε την επαφή με το υπόστρωμα ενζύμου TMB (3,3΄,5,5΄ τετραμεθυλο-βενζιδίνη).
- Σταματήστε λύση περιέχει οξύ. Η συγκέντρωση αυτή κρίνεται ακίνδυνη. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα.
- Ο έλεγχος, το ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων και το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης περιέχουν ως συντηρητικό αζίδιο νατρίου 0.09%. Η συγκέντρωση αυτή κρίνεται ακίνδυνη.
- Το σύζευγμα ενζύμου περιέχει ως συντηρητικό 0.05% ProClin 300. Η συγκέντρωση αυτή κρίνεται ακίνδυνη.

Κατά τον χειρισμό των αντιδραστηρίων, των ελέγχων και των δειγμάτων των ασθενών, πρέπει να τηρούνται οι ισχύουσες οδηγίες ασφαλείας εργαστηρίων και η Καλή Εργαστηριακή Πρακτική:

- Μέτρα πρώτων βοηθειών:
  Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε το δέρμα αμέσως καλά με νερό και σαπούνι. Βγάλτε τα επιμολυσμένα ενδύματα και υποδήματα και πλύνετέ τα, πριν τα ξαναφορέσετε. Σε περίπτωση που το υγρό συστήματος έρθει σε επαφή με το δέρμα, πλύνετε το δέρμα καλά με νερό. Μετά από ενδεχόμενη επαφή με τα μάτια, πλύνετε τα μάτια με ανοιχτά τα βλέφαρα, τουλάχιστον 10 λεπτά, με τρέχον νερό. Επισκεφθείτε γιατρό, αν απαιτείται.
- Μέτρα σε περίπτωση ακούσιας αποδέσμευσης:
  Τηρείτε τις οδηγίες ασφαλείας της Καλής Εργαστηριακής Πρακτικής. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Μη καταπίνετε. Απαγορεύεται η χρήση πιπέτας από το στόμα. Στις περιοχές όπου χρησιμοποιούνται δείγματα ή στοιχεία του προϊόντος, απαγορεύεται η κατανάλωση φαγητού και υγρών, το κάπνισμα ή το μακιγιάρισμα. Απορροφήστε χυμένο υλικό με αδρανές υλικό και απορρίψτε το στα κατάλληλα απορρίμματα.
- Προσωπικός προστατευτικός εξοπλισμός:
  Φοράτε προστατευτικά γάντια από νιτρίλιο ή λάτεξ. Φοράτε προστατευτικά γυαλιά. Δεν παρατηρήθηκαν επικίνδυνες αντιδράσεις, όταν η συσκευή χρησιμοποιείται για τον προβλεπόμενο σκοπό.
- Συνθήκες χρήσης, που πρέπει να αποφευχθούν:
  Αποθηκεύετε την σε σκοτεινό μέρος, διότι το υπόστρωμα του TMB είναι φωτοευαίσθητο.
- Τα απορρίμματα θα πρέπει να απορρίπτονται συμφώνα με την εθνική και τοπική νομοθεσία περί προστασίας του περιβάλλοντος.

Οι οδηγίες για τον ποιοτικό έλεγχο στο ιατρικό εργαστήριο σχετικά με τη χρήση ορών ελέγχου πρέπει να τηρούνται.

4 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ

Σύμβολα		Επαπκέρ για 96 προσδιορισμούς
MICROPLATE	1	Ένα διαιρετό μικροπλάκα αποτελείται από 12 ενότητες στις 8 φατνία. Έτοιμο προς χρήση.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	***Βαθμονομητής A,* 0 IU/mL**, που περιέχει στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%). Έτοιμο προς χρήση.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	***Βαθμονομητής B,* 12,5 IU/mL**, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	***Βαθμονομητής C,* 25 IU/mL**, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	***Βαθμονομητής D,* 50 IU/mL**, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	***Βαθμονομητής E,* 100 IU/mL**, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	***Βαθμονομητής F,* 200 IU/mL**, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση.
CONTROL +	1x 1.5 mL	***Έλεγχος θετικό,***, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση. Η συγκέντρωση που καθορίζεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης.
CONTROL −	1x 1.5 mL	***Έλεγχος Διάλυση***, που περιέχει αντισώματα dsDNA στον ορό / ρυθμιστικό μήτρα (PBS, η BSA, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09%), κίτρινος. Έτοιμο προς χρήση. Η συγκέντρωση που καθορίζεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης.
DILUENT	20 mL	***Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων PD***, PBS, BSA, απορρυπαντικό,·NaN_3 0,09% ως συντηρητικό, κίτρινο,·συμπυκνωμένο (5x).
CONJUGATE	15 mL	***Σύζευγμα ενζύμου***; · περιέχει αντι-ανθρώπινα αντισώματα **IgG** σημαδεμένα με υπεροξειδάση, PBS, BSA, απορρυπαντικό· 0,05% ProClin ως συντηρητικό, ανοιχτό κόκκινο. Έτοιμο προς χρήση.
TMB	15 mL	***TMB διάλυμα υποστρώματος*** ; 3,3', 5,5'- τετραμεθυλιακής βενζιδίνης, άχρωμο Έτοιμο προς χρήση.
STOP	15 mL	***Σταματήστε λύση***; Περιέχει οξύ. Έτοιμο προς χρήση.
WASH	20 mL	***Πλυστικό Διάλυμα***, περιέχει τρις, απορρυπαντικό, NaN_3 0.09% ως συντηρητικό συμπυκνωμένο (50x).
	1	Οδηγίες Χρήσης (IFU)
	1	Πιστοποιητικό Ανάλυσης

5 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας ικανή παράμετρο των μετρήσεων στα 450 nm; Προαιρετικό: φίλτρο αναφοράς στα 620 nm
- Λογισμικό μείωση Δεδομένων
- Multi-channel αεροζόλ ή επαναλαμβανόμενη πιπέτας για 100 µL
- Vortex μίξερ
- Πιπέτες για 10 µL, 100 µL και 1000 µL
- Η συσκευή χρονοδιάγραμμα Εργαστήριο
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Μέτρηση κύλινδρο για 1000 mL και 100 mL
- Πλαστικό δοχείο για την αποθήκευση του διαλύματος πλύσης

Η δοκιμασία ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ανοικτό αυτόματο ELISA. Η αίτηση πρέπει να επικυρώνεται από την αντίστοιχη αυτοματοποιημένο σύστημα. Οι πληροφορίες παρέχονται κατόπιν αιτήσεως.

6 ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

- Η δειγματοληψία αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις ισχύουσες προδιαγραφές και με τις κατάλληλες διαδικασίες.
- Αφήστε το αίμα να πήξει και αποκτήστε τον ορό μέσω φυγοκέντρησης.
- Πρέπει να αποφεύγετε την χρήση αιμολυτικών, λιπαιμικών και υκτερικών ορών.
- Δείγματα ορών και πλάσματος αίματος μπορούν να διατηρηθούν σε δροσερό μέρος θερμοκρασίας 2 °C - 8 °C για μέχρι 5 ημέρες. Εάν επιθυμείτε αποθήκευση μεγαλύτερης διαρκείας, τότε τα δείγματα θα έπρεπε να διαμελιστούν και να καταψυχθούν στους -20 °C.
- Να αποφεύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων!
- Δεν συνιστάται η χρήση ορών που δεν ενεργοποιούνται με θερμότητα.

7 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

- Αποθήκευση των δοκιμαστικών ταινιών στους 2 °C - 8 °C σε σκοτεινό μέρος.
- Κατά την αποθήκευση και τη χρήση απαγορεύεται η έκθεση των αντιδραστηρίων στη θερμότητα, τον ήλιο ή το έντονο φως.
- Αποθηκεύστε τις σφραγισμένες μικροπλάκα , μαζί με το αποξηραντικό με το οποίο διατίθενται, μέσα στη σακούλα που κλείνει με κλιπ.
- Η σφραγισμένη συσκευασία δοκιμής διατηρείται 18 μήνες από την ημέρα παραγωγής. Τα σφραγισμένα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης της συσκευασίας δοκιμής. Βλέπε ετικέτα εκάστης παρτίδας.
- Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων διατηρούνται στους 2 °C - 8 °C τουλάχιστον 30 ημέρες. Συνιστάται να χρησιμοποιηθούν την ίδια ημέρα.

8 ΓΕΝΙΚΕΣ ΥΠΟΔΕΙΞΕΙΣ

- Μην χρησιμοποιείτε τα συστατικά του κιτ πέραν ημερομηνίες λήξης τους.
- Μην αλλάζετε τα συστατικά του κιτ από διαφορετικές παρτίδες και προϊόντα.
- Όλα τα υλικά πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C - 28 °C) πριν από τη χρήση.
- Προετοιμάστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα. Μόλις ξεκίνησε, το τεστ παίξουν χωρίς διακοπή.
- Διπλό προσδιορισμοί μπορεί να γίνει. Με τον τρόπο αυτό πιπέτα λάθη μπορεί να γίνονται εμφανή.
- Ακολουθήστε τα βήματα ανάλυσης μόνο με τη σειρά που αναφέρονται.
- Χρησιμοποιείτε πάντα φρέσκα αραιώσεις δειγμάτων.
- σιφώνιο όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα στο πυθμένα των πηγαδιών.
- Για να αποφευχθεί η μεταφορά ή η μόλυνση, να αλλάξετε το ρύγχος πιπέτας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και ελέγχου του κιτ.
- Πλένετε σχολαστικά μικροβυθίσματα και απομακρύνονται τα τελευταία σταγονίδια του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
- Όλα τα βήματα της επώασης πρέπει να χρονική ακρίβεια.
- Μην χρησιμοποιείτε ξανά τα πηγαδάκια της μικροπλάκας.

9 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

(WASH)

Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου του συμπυκνωμένου διαλύματος 50x (20 mL) πρέπει να το αραιώνεται πριν από την χρήση προσθέτοντας απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 1000 mL (1 λίτρο).

Δείγμα Ρυθμιστικό PD (DILUENT)

Πριν από τη χρήση διαλύεται το περιεχόμενό της (20 ml) ένα φιαλίδιο ρυθμιστικού διαλύματος του δείγματος 5x συμπυκνωμένο με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 100 mL.

10 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αραιώστε τα δείγματα ασθενών **1:100** πριν από την ανάλυση: προσθέστε 10 µL του δείγματος + 990 µL αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος σε σωλήνα πολυστυρένιο. Ανακατέψτε καλά.

Σημείωση: Οι βαθμονομητές / μάρτυρες είναι έτοιμα για χρήση και δεν χρειάζονται αραίωση.

11 ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Ετοιμάστε αρκετό ενότητες μικροπλάκα για όλους τους βαθμονομητές / ελέγχου και δείγματα ασθενών.

1. Προσθέστε **100 µL** του βαθμονομητές, τους μάρτυρες και τα δείγματα των ασθενών αραιωμένος στα πηγαδάκια.
2. Επωάστε για **30 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C - 28 °C).
3. Απορρίψτε τα περιεχόμενα των μικροβυθισμάτων και πλύνετε **3 φορές με 300 µL** διαλύματος πλύσης.
4. Διανέμονται **100 µL**συζεύγματος ενζύμου σε κάθε πηγαδάκι.
5. Επωάστε για **15 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Απορρίψτε τα περιεχόμενα των μικροβυθισμάτων και πλύνετε **3 φορές με 300 µL** διαλύματος πλύσης.
7. Διανείμετε **100 µL TMB** Διάλυμα Υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι.
8. Επωάστε για **15 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθέστε **100 µL** Διαλύματος Παύσης σε κάθε πηγαδάκι των ενοτήτων
10. Επωάστε για **5 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Διαβάστε την οπτική πυκνότητα στα 450 nm (αναφορά 600-690nm) και να υπολογίσει τα αποτελέσματα. Η ανάπτυξη του χρώματος είναι σταθερή για τουλάχιστον 30 λεπτά. Διαβάστε τη διάρκεια αυτής της περιόδου.

Παράδειγμα για ένα σύστημα διανομής με πιπέτα:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Δείγματα A-F Βαθμονομητής C+, C- Έλεγχος

12 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

Τα αποτελέσματα των δοκιμών είναι έγκυρη, εάν οι οπτικές πυκνότητες στα 450 nm για βαθμονομητές / ελέγχων και τα αποτελέσματα των ελέγχων σύμφωνα με τα διαστήματα αναφοράς που αναφέρεται στο Πιστοποιητικό Ανάλυσης που περικλείεται σε κάθε κιτ.

Αν δεν πληρούνται αυτά τα κριτήρια ελέγχου της ποιότητας η λειτουργία της μεθόδου είναι άκυρη και θα πρέπει να επαναληφθεί.

13 ΕΡΜΗΝΕΊΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΆΤΩΝ

Για ποσοτικά αποτελέσματα οικόπεδο η οπτική πυκνότητα του κάθε βαθμονομητή έναντι της συγκέντρωσης βαθμονομητή για τη δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης. Η συγκέντρωση των δειγμάτων ασθενών μπορούν να εκτιμηθούν στη συνέχεια από την καμπύλη βαθμονόμησης με παρεμβολή.

Λογισμικό για την επεξεργασία δεδομένων με καμπύλης 4-παραμέτρων και lin-log συντεταγμένες για την οπτική πυκνότητα και η συγκέντρωση είναι η καλύτερη μέθοδος.

14 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΆ ΠΡΟΪΌΝΤΟΣ

14.1 ΡΥΘΜΙΣΗ

Το σύστημα προσδιορισμού είναι βαθμονομημένο έναντι του διεθνούς προετοιμασία αναφοράς WHO Wo/80 για αντισώματα ως human anti-dsDNA IgG 200 IU/mL.

14.2 Περιοχή μέτρησης

Το εύρος μέτρησης ανέρχεται σε 0 - 200 IU/mL

14.3 Φυσιολογικές τιμές

Στο πλαίσιο μελέτης του εύρους φυσιολογικών τιμών, με δείγματα από υγιείς αιμοδότες, εντοπίστηκαν οι εξής τιμές:

αξία των συνόρων 20 IU/mL

14.4 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Διάλυση: < 20 IU/mL

θετικό: ≥ 20 IU/mL

14.5 Γραμμικότητα

Δείγματα ασθενών, με υψηλή ειδική συγκέντρωση αντισωμάτων, αραιώθηκαν γραμμικά σε ρυθμιστικά διαλύματα δειγμάτων, προκειμένου να απεικονιστεί το δυναμικό εύρος της δοκιμής, καθώς και το άνω και κάτω όριο της γραμμικότητας. Η ενεργητικότητα των αντισωμάτων κάθε βαθμίδας αραίωσης υπολογίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης με τη χρήση 4-παραμέτρων-Fit με lin-log συντεταγμένες.

Δείγμα	Διάλυση	Παρατηρούμενη [IU/mL]	Αναμενόμενη [IU/mL]	Π/Α [%]
1	1:100	104,2	104,2	100
	1:200	50,6	52,1	97
	1:400	24,9	26,1	95
	1:800	11,2	13,0	86
2	1:100	135,3	135,3	100
	1:200	68,9	67,7	102
	1:400	35,2	33,8	104
	1:800	18,2	16,9	108

14.6 Όριο ανίχνευσης

λειτουργική ευαισθησία: 1 IU/mL

14.7 Τεχνικά Χαρακτηριστικά

Ακρίβεια εσωτερικής ανάλυσης:

Ο συντελεστής διαφοροποίησης υπολογίστηκε για τρία δείγματα, με 24 μετρήσεις έκαστο, σε μία εκτέλεση προγράμματος. Τα αποτελέσματα της ακρίβειας της σειράς συνοψίστηκαν στον πίνακα.

Ακρίβεια ενδιάμεσης ανάλυσης:

Ο συντελεστής διαφοροποίησης υπολογίστηκε για τρία δείγματα, με 6 μετρήσεις έκαστο, σε 5 εκτελέσεις προγράμματος. Τα αποτελέσματα της ακρίβειας κάθε εκτέλεσης προγράμματος συνοψίστηκαν στον πίνακα.

Εντός της ανάλυσης		
Δείγμα	Μέσος όρος [IU/mL]	CV [%]
1	26,0	4,5
2	61,0	3,1
3	114,0	6,4

Μεταξύ των αναλύσεων		
Δείγμα	Μέσος όρος [IU/mL]	CV [%]
1	29,0	12,4
2	68,0	7,3
3	138,0	5,2

14.8 Επιδράσεις

Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση από αιμολυτικούς ορούς (έως 1000 mg/dL), λιπαιμικούς ορούς (έως 3 g/dL τριγλυκερίδια) ή ορούς που περιέχουν χολερυθρίνη (έως 40 mg/dL).

Επίσης δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις από τη χρήση αντιπηκτικών (EDTA, ηπαρίνη, κιτρικό).

14.9 Αποτελέσματα μελέτης

Ομάδα πληθυσμού	n	n Pos	[%]
SLE	202	164	81,2
Other autoimmune diseases	33	1	3,0
Normal human serum	115	1	0,9

		Κλινική διάγνωση		
		Pos	Neg	
EIA-3438	Pos	164	2	
	Neg	38	146	
		202	148	350

Ευαισθησία:	81,2 %
Ειδικότητα:	98,6 %
Διαγνωστική αποτελεσματικότητα:	88,6 %

15 ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Αυτή η ανάλυση είναι ένα διαγνωστικό βοήθημα. Η τελική κλινική διάγνωση δεν πρέπει να βασίζεται στα αποτελέσματα μίας μόνο δοκιμασίας, αλλά πρέπει να γίνει από τον ιατρό μετά από όλα τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα έχουν αξιολογηθεί σχετικά με το σύνολο της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Επίσης, κάθε απόφαση για θεραπεία θα πρέπει να λαμβάνονται σε ατομική βάση.

Οι παραπάνω παθολογικές και τα φυσιολογικά όρια αναφοράς για αντισώματα σε δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως συστάσεις. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθιερώσει δικές της σειρές, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 15189 ή άλλες ισχύουσες κατευθυντήριες γραμμές εργαστήριο.

16 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA / RÉFÉRENCES / REFERÊNCIAS LITERÁRIAS / REFERENCE / / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΈΣ ΑΝΑΦΟΡΈΣ

1. Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis.
   Ann Rheum Dis 2003; 62(6):556-560.
2. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test.
   Lupus 2010; 19(8):906-912.
3. Brouwer R, Hengstman GJ, Vree EW, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis.
   Ann Rheum Dis 2001; 60(2):116-123.
4. Castro C, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity.
   J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2):S238-S247.
5. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G et al. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies.
   Autoimmun Rev 2011; 10(3):150-154.
6. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of Systemic Lupus Erythematosus in northern Sweden.
   Arthritis Research & Therapy 2011; 13(1):R30.
7. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity.
   Ann Rheum Dis JID - 0372355 2004; 63(4):386-394.
8. Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity.
   Lupus 2011; 20(3):250-255.
9. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?
   Rheumatology (Oxford) 2007; 46(7):1052-1056.
10. Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases.
    Immunol Rev 2010; 233(1):126-145.
11. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited.
    Diagn Pathol 2009; 4:1.
12. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations.
    Ann Rheum Dis 2010; 69:1420-1422.
13. Petri M, Magder L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review.
    Lupus 2004; 13(11):829-837.
14. Poole BD, Schneider RI, Guthridge JM, Velte CA, Reichlin M, Harley JB et al. Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2009; 60(3):848-859.
15. Putova I, Dostal C, Becvar R. Prevalence of antinucleosome antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune systemic diseases.
    Ann N Y Acad Sci 2007; 1109:275-286.
16. Reveille JD. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus.
    Lupus JID - 9204265 2004; 13(5):290-297.
17. Simon JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker.
    Rheumatology (Oxford) 2004; 43(2):220-224.
18. Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs.
    Clin Lab 2007; 53(3-4):183-191.
19. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases.
    Am J Clin Pathol 2002; 117(2):316-324.
20. Maidhof W., Hilias O. Lupus: an pverview of the disease and management options.
    P T 2012; 37(4):240-9.
21. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis.
    Arthritis Care Res (Hoboken) 2012; 64(6):797-808.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português	Český
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia	Označení CE
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de utilização	Viz návod k pouţití
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro*-Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo	Katalogové číslo
LOT	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote	Kód šarţe
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações	Dostačuje pro
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation	Limites de temperatura	Teplotní omezení
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade	Spotřebujte do
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante	Výrobce
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor	
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação	
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos	
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado	
UDI	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *	
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches		
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo	
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade	

Symbol	English	Ελληνικά
CE	European Conformity	Ευρωπαϊκή συμμόρφωση
	Consult instructions for use *	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολιγικό προιόν
REF	Catalogue number *	Αριθμός καταλόγου
LOT	Batch code *	Αριθμός παρτίδας
	Contains sufficient for <n> tests *	Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις
	Temperature limit *	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Use-by date *	Ημερομηνία λήξης
	Manufacturer *	Κατασκευαστής

Symbol	English	Ελληνικά
	Distributor *	
	Date of manufacture *	
	Biological risks *	
	Caution *	
UDI	Unique device Identifier *	
RUO	For research use only	Περιεχόμενο
Volume/No.	Volume / No.	Όγκος / Όχι