

TESTSYSTEMET RELISA® FÖR anti-dsDNA-ES

Använd för in vitro-diagnostik

För yrkesmässigt bruk

Katalognummer: 7096-18 (96 brunnar) och 7696-18 (576 brunnar)

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett testsystem för enzymimmunoanalys för detektering av antikroppar mot dsDNA i humanserum. Detta testsystem ska användas som ett hjälpmedel vid diagnos av systemisk lupus erythematosus.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TEST

Anti-dsDNA-antikroppar har blivit en etablerad diagnostisk markör för SLE och används även av kliniker för att övervaka sjukdomsförloppet sedan dess upptäckt år 1957 och efterföljande inklusion i de reviderade American College of Rheumatology-kriterierna för klassificeringen av SLE (systemisk lupus erythematosus) (1-3). De tre vanligaste diagnostiska metoderna är ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), *Crithidia luciliae* IFA (immunofluorescensanalys), och Farr RIA (radioimmunanalys). Den starkt framträdande utmärkande egenskapen för dessa metoder är deras olika selektivitet gentemot antikroppar med olika aviditeter. Medan den *Crithidia*-baserade metoden gynnar antikroppar med låg aviditet, och ELISA identifierar arter med både låg och hög aviditet, identifierar Farr-metoden huvudsakligen antikroppar med hög aviditet på grund av den höga ammoniumsulfatkoncentration som används (4-7).

I studier som nyligen utförts har forskare visat ett samband mellan sjukdomars allvarlighetsgrad och antikropsaviditet och funnit att förmågan att gruppera patienter i dem med godartad variant av SLE och dem med hud- och njursymtom berodde på vilken analys som valdes (7-10). När serum från patienter med "definitiv" SLE testas med dessa tre analyser överensstämmer i allmänhet resultaten. Detta är dock inte fallet för patienter som inte passar in i standardkriterierna för klassificering av SLE eller som har inaktiv sjukdom. För dessa individer är diagnos mer beroende av valet av analys. Av dessa och andra orsaker anses Farr-analysen av många experter att vara den som gäller. Både den arbetsintensiva analysen och användningen av radioisotoper gör denna analys besvärlig.

Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA-ES har utformats för att kombinera de bästa aspekterna av två befintliga metoder till ett enda analysformat. Det representerar mer stränga bindningsvillkor än det klassiska anti-dsDNA ELISA och kombinerar därför Farr-metodens selektivitet med hög aviditet med bekvämligheten i ELISA-formatet. Vår nya teknik har utformats så att den ska påminna mycket om de selektiva Farr-förhållandena. I en oberoende studie som jämförde ELISA metoder till Farr analysen visade Immuno Concepts dsDNA-ES-analysen 93% specificitet för dsDNA-antikroppar. En liknande dsDNA ELISA-test som inte hade den hög-aviditet selektivitet visade endast 60% specificitet i denna studie (11).

Patienter med SLE (systemisk lupus erythematosus) kan framställa antikroppar mot en rad olika nukleära antigener, men antikroppar som riktas mot Sm (Smith-antigen) och dubbelsträngad DNA (dsDNA) visar det högsta sambandet med sjukdomen (12). Antikroppar som riktas mot Sm påvisar ett fläckigt ANA-färgningsmönster medan antikroppar som riktas mot dsDNA i allmänhet påvisar ett homogent ANA-färgningsmönster. Även om det kan finnas låga nivåer med anti-dsDNA-antikroppar i serum för patienter med reumatoid artrit, Sjögrens syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyositis, skivformig lupus erythematosus och blandad bindvävsjukdom (13), finns höga nivåer med dsDNA-antikroppar nästan uteslutande i SLE. Antikroppar mot dsDNA tros vara inblandade i patogenesen vid de mest allvarliga

variationerna av SLE när de avsätts som immuna komplex (14). Antikroppar mot dsDNA sker i hög titer, och, eftersom de korrelerar med sjukdomsaktivitet (15), är deras upptäckt viktig vid vården av SLE-patienter. Flera analyser finns tillgängliga för identifieringen av antikroppar mot anti-dsDNA. De metoder som används mest innefattar indirekt immunofluorescens, radioimmunoanalys, counter-immunoelektrofores och immunodiffusion (16-19). Testsystemet RELISA[®] för anti-dsDNA-ES från Immuno Concepts är en EIA-metod (enzymimmunoanalys) som identifierar serumantikroppar mot dsDNA.

TESTPRINCIP

Den här analysen är en indirekt EIA. Stabiliserade dsDNA-antigener har belagts på ytan i mikrobrunnarna för att fungera som ett antigensubstrat i detta system. Utspädningar av patientprover placeras i mikrobrunnarna och inkuberas, vilket tillåter att specifika antikroppar i provet reagerar med antigenet i den fasta fasen. Efter tvätt för att avlägsna obunden antikropp och andra serumproteiner, inkuberas brunnarna med get-antihumana antikroppar som märks med pepparrotsperoxid. Pepparrotsperoxidaskonjugerat antikroppspreparat som ingår i testsystemet är specifikt för humana IgG-gammakedjor.

Om resultaten är positiva, gäller att efter inkubering med pepparrotsperoxidaskonjugat bildas det ett stabilt komplex i tre delar. Detta komplex består av pepparrotsperoxidaskonjugerad antihumanantikropp bunden till humana antikroppar mot dsDNA, som är bundna till antigen som stabiliserats på plastytan.

Efter ytterligare ett tvättningssteg identifieras detta komplex genom att tillsätta en lösning med tetrametylbenzidin (TMB) och H₂O₂ som kromogeniskt substrat. Färgutvecklingsgraden i varje brunn är proportionerlig till koncentrationen av antikroppar mot dsDNA i varje serumprov. Varje mikrobrunn avläses i en spektrofotometer vid 450 nm.

SYSTEMKOMPONENTER - TILLHANDAHÅLLET MATERIAL

Förvaring: Alla komponenter ska förvaras kylda mellan 2 och 10 °C förutom tvättbuffertkoncentratet, som lagras vid rumstemperatur (18-24 °C). Fryses ej.

Stabilitet: Alla komponenter förblir stabila i minst 12 månader från tillverkningsdatum. Använd inte någon komponent senare än dess utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

dsDNA-belagda mikrobrunnaremsor: Katalognr 7008-17. En mikrobrunnram som innehåller tolv åttabrunnsremсор belagda med dsDNA. Om färre än åtta brunnar behövs för analys kan brunnarna åtskiljas genom att snäppa isär dem. De oanvända remsorna kan läggas tillbaka i foliepåsen med packen med inert absorptionsmaterial, förseglas med dragkedjeförsegling och kylas i upp till 45 dagar.

Provspädningsmedel: Katalognr 7100 (100 ml). Egettillverkat buffrat provspädningsmedel som används för utspädning av patientprover.

Enzymantikroppsreagens - Humant IgG-gammakedjespecifikt: Katalognr 7009-18 (14 ml). Get-anti-human IgG (gammakedjespecifikt) konjugerad med pepparrotsperoxid (HRP). Reagenset är klart för användning.

Substratlösning: Katalognr 7035 (14 ml). HRP-specifik enzymsubstratlösning som innehåller stabiliserat 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) och väteperoxid (H₂O₂). Reagenset är klart för användning.

Stoppreagens: Katalognr 7033 (14 ml). Egettillverkat stoppreagens för EIA-testsystem från Immuno Concepts. Reagenset är klart för användning. **VAR FÖRSIKTIG:** Frätande. Det här reagenset innehåller saltsyror och svavelsyror (mindre än 3 procent vardera, per volym), och bör hanteras med försiktighet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om det förekommer kontakt med ögonen, spola omedelbart och rikligt med vatten och kontakta läkare. Fyll aldrig på det här reagenset med vatten.

Positiv kontroll för anti-dsDNA-ES: Katalognr 7021-18 (2 ml). Humanserum för positiv kontroll som innehåller antikroppar mot dsDNA. Detta serum är i en arbetsutspädning och klart för användning. Se ampul etikett för förväntat intervall i internationella enheter per milliliter (IU/ml).

Negativ kontroll: Katalognr 7031 (2 ml). Humanserum för negativ kontroll som inte innehåller antikroppar mot dsDNA. Detta serum är i en arbetsutspädning och klart för användning.

Anti-dsDNA-ES kalibreringsserum 1 t.o.m. 4: Katalognummer 7261-18, 7262-18, 7263-18, 7264-18 (1,5 ml vardera). Humankalibreringsserum som innehåller antikroppar mot dsDNA. Dessa kalibreringsserum tillhandahålls vid arbetsutspädning och är klara för användning. Kalibrerare 3 kan användas som enpunktskalibrerare. Dessa kalibrator serum har testats med WHO referenspreparat Wo80 att bestämma antikropps-koncentrationen i internationella enheter / ml (IU / ml). Se via etiketterna för anti-dsDNA antikropps-koncentration i IU / ml.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

Mikrobrunnshållare

Tvättbuffertlösning:

Tvättbuffertkoncentrat: Katalognr 1031ES (100 ml). Koncentrerad tvättbuffert som ska användas för att preparera arbetande tvättbuffertlösning. Förvaras vid rumstemperatur (18-24 °C). OBS! Det kan bildas kristaller i tvättbuffertkoncentratet vid 2-10 °C. Dessa kristaller går tillbaka till lösning vid rumstemperatur. För optimala resultat, ta ut flaskan med tvättbuffertkoncentrat ur satsen vid ankomst och förvara den vid rumstemperatur tills tvättbuffertlösningen har preparerats. Den Tvättbuffertkoncentrat kan verka svagt gul till orange. Detta är godtagbart för användning.

Preparering: Tvättbuffertkoncentratet MÅSTE vara vid rumstemperatur och alla kristaller MÅSTE vara i lösning före prepareringen av tvättbuffertlösningen. Lägg till innehållet i 100 ml-flaskan med tvättbuffertkoncentrat i 900 ml med avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda väl och förvara vid 2-24 °C i upp till fyra (4) veckor eller tills det finns tecken på förorening eller andra synliga förändringar. Tvättbuffertlösning måste vara vid rumstemperatur (18 till 24 °C) före användning.

Användning: Alla komponenter levereras klara för användning utan att alikvotering eller omkonstituering krävs (förutom tvättbuffertkoncentratet som måste spädas ut i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

Förvaring: Alla komponenter kan förvaras kylda vid 2-10 °C förutom tvättbuffertkoncentratet, som lagras vid rumstemperatur (18-24 °C). Efter omkonstituering kan tvättbuffertlösningen lagras i behållare med skruvlock vid 2-24°C.

Stabilitet: Alla komponenter förblir stabila i minst 12 månader från tillverkningsdatum. Använd inte någon komponent senare än dess utgångsdatum.

YTTERLIGARE MATERIAL SOM KRÄVS - MEN SOM INTE TILLHANDAHÅLLS

Volymetriska precisionspipetter som levererar 25-1000 µl-volymer
Krama flaskan för att tillsätta tvättbuffertlösning i mikrobrunnar, eller ett automatiserat eller halvautomatiserat tvättsystem för mikrobrunnar
Enlitersbehållare för tvättbuffertlösning
Avjoniserat eller destillerat vatten
Spektrofotometer för plattavläsningar som kan avläsa absorbans vid 450 nm
Provrör för att preparera utspädningar av serum
Fuktighetsabsorberande papper eller hushållspapper
Flerkanalig pipett som kan leverera till åtta (8) brunnar
Engångshandskar
Tidtagarur

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material som härstammar från människor som används för den här produkten har analyserats och befunnits negativt (inte upprepade reaktiva) för antikroppar mot HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-11), HIV-2 (Human Immunodeficiency Virus-2), HCV (hepatit C-virus), och för HBsAg (hepatit B-ytantigen) med FDA-godkända metoder. Det finns dock ingen analysmetod som kan erbjuda fullständig försäkran om att HIV-1, HIV-2, hepatit C, hepatit B eller andra smittosamma agenser är frånvarande. Därför ska allt satsmaterial hanteras på samma sätt som potentiellt smittosamt material.
2. Alla patientprover ska hanteras på Biosafety Level 2 (biosäkerhetsnivå 2) enligt vad som rekommenderas för allt potentiellt smittosamt humanserum eller blodpreparat i handboken från USA:s Centers for Disease Control/National Institute of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.

3. Utspädning av komponenter eller ersättning med andra komponenter än dem som finns i detta system kan ge motsägande resultat.
4. Natriumazid (0,09 procent) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med rör av bly eller koppar och bilda explosiva metallazidsalter. Vid avyttring av reagenser, spola med stora volymer kranvatten för att förhindra potentiella rester i rören. Natriumazid är ett gift och kan vara giftigt om det förtärs.
5. Den här satsen är för diagnostisk användning *in vitro*.
6. Pipettera aldrig via munnen och undvik kontakt från reagenser och preparat med hud och slemhinnorna. Om kontakt uppstår, tvätta med bakteriedödande tvål och rikliga mängder vatten.
7. Rök inte, ät inte och drick inte i områden där preparat eller satsreagenser hanteras.
8. Undvik alltid stänk eller generering av aerosoler.
9. Andra inkuberingstider and temperaturer än dem som anges kan ge felaktiga resultat.
10. Förorening av reagenser och/eller prover kan ge falska resultat. Prover måste förbli begränsade till mikrobrunnar under analys.
11. Återanvändbart glas måste tvättas och noggrant sköljas fritt från diskmedel före användning. Allt glas måste vara rent och torrt före användning.
12. Före användning ska alla reagenser, mikrobrunnar och preparat vara vid rumstemperatur (18 till 24 °C).
13. Bär engångshandskar vid hantering av preparat och reagenser och tvätta noggrant händerna efteråt.
14. Mikrobiell förorening av reagenser eller prover kan ge falska resultat.
15. Stoppreagenset är frätande och kan leda till brännskador. Det här reagenset innehåller saltsyror och svavelsyror (mindre än 3 procent vardera, per volym), och bör hanteras med försiktighet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om det förekommer kontakt med ögonen, spola omedelbart och rikligt med vatten och kontakta läkare. Fyll aldrig på det här reagenset med vatten.

INSAMLING AV PREPARAT

Insamling: Serum är det preparat som föredras. Ungefär 5 ml med helblod ska insamlas aseptiskt genom venpunktion med ett sterilt vakuumsamlingsrör eller annat passande insamlingssystem. Låt blodet koagulera vid rumstemperatur (mellan 18 och 24 °C). Serum ska åtskiljas från koagler genom centrifugering så snart som möjligt för att minimera hemolys.

Störande substanser: Serum som påvisar en hög grad med hemolys, gulsot, lipidemi eller mikrobiell tillväxt ska inte användas eftersom dessa förekomster kan orsaka falska resultat. Preparat som innehåller synliga partiklar ska klargöras genom centrifugering före analys.

Förvaring: Serum kan förvaras vid mellan 2 och 10 °C i upp till en vecka. Om analys fördröjs ytterligare ska serum förvaras fruset vid -20 °C eller lägre temperatur. Serum ska inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller frys.

VAR FÖRSIKTIG: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge falska positiva eller falska negativa resultat.

ALLMÄNNA PROCEDURANMÄRKNINGAR

1. Det är extremt viktigt att ha alla satskomponenter och serumprover vid rumstemperatur (18 till 24 °C) före användning. En hel liter med tvättbuffert kan kräva flera timmar för att värmas upp till 20 °C efter det att den tagits ut ur kylskåpet. Inkuberingstemperaturer över eller under angivet intervall kan leda till felaktiga resultat. Sätt tillbaka oanvända prover och reagenser i kyld förvaring efter användning.
2. Blanda reagenserna väl före användning med varsam inversion. Snurra inte och skaka inte reagenser. Undvik skumbildning.
3. Vid förberedelse av provspädningar ska pipettspetsarna torkas av före dispensering av serum i preparatspädningsmedlet. Överflödigt prov som fastnar på utsidan av pipettspetsen påverkar resultaten.
4. Användning av en flerkanalig pipett rekommenderas eftersom den ger mer enhetlig reagensdispensering, enhetliga inkuberings- och reaktionstider.
5. **Tillräcklig tvätt av brunnar är extremt viktigt.** Otillräckligt tvättade brunnar kommer att påvisa höga bakgrundsvärden och kan visa falska positiva värden. För manuell tvättning, aspirera innehållet i brunnarna och fyll sedan varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik förorening av brunnar, i synnerhet i den första tvätten efter aspireringen. Töm ut all tvättbuffert från brunnarna genom att vända dem upp och ner och skaka sedan av resterande tvättbuffert från brunnarna med en skarp "snäppande" rörelse av handleden. Upprepa stegen för påfyllnad och tömning under sammanlagt tre till fem tvättar. Brunnarna ska sedan knackas med stor kraft på en bit hushållspapper eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av resterande tvättbuffert. Användning av ett automatiserat tvättsystem för mikrobrunnar säkerställer konsekvent tvättning av brunnarna och rekommenderas.

OBS! På grund av de olika typerna av tvättmetoder och automatiserade system kan antalet tvättar justeras för att erhålla optimala resultat. Varje labb ska avgöra det mest effektiva antalet tvättar för sitt tvättsystem.

- Otillräckligt avlägsnande av resterande tvättbuffert kan leda till avvikande färgutveckling. Mikrobrunnsremсор ska torkas av på absorberande papper eller hushållspapper för att minimera resterande tvättbuffert.
- Tiden för alla steg är enormt viktig. Alla serumprover ska spås ut innan proceduren påbörjas och de måste dispensereras i mikrobrunnar under en så kort tidsperiod som möjligt (inte mer än fem minuter). Satsstorlekar ska anges så att preparathantering kan utföras väl inom den här tidsperioden. Användningen av en pipett med flera kanaler underlättar hanteringen av prover och reagenser, och rekommenderas.
- Med undantag av den senaste inkuberingen (substratlösning), startar början av varje inkuberingsperiod med slutförande av prov- eller reagensdispensering. Inkuberingen av substratlösningen måste vara exakt 30 minuter lång för varje brunn. Alla prover och reagenser ska dispensereras i samma sekvens och med en konstant hastighet.

TOLKNING AV RESULTAT

Beräkningar

- Subtrahera absorbansvärdet för brunnen med reagensblank från absorbansvärdena som erhållits från kalibrerings-, kontroll- och patientprovsbrunnar. Beräkna genomsnittliga absorbansvärden för dubbla brunnar.
- Plotta genomsnittligt absorbansvärde för varje kalibreringsserum 1 t.o.m. 4 på arbetsbladet för RELISA® kalibreringskurvan med nolljusterad yttre diameter för y-axeln och märkt IU/ml-värde för x-axeln. Dra en linje för bästa passning mellan kalibrerarpunkterna.
- Erhåll IU/ml-värdet för varje patientprov genom att interpolera från kalibreringskurvan.
- Om du använder programvara, använd en 4-parameterspassning med lin-log-koordinater för optisk densitet och koncentration, och en kurva med bästa passning.

ENPUNKTSKALIBRERINGSMETOD SOM TILLVAL

- Subtrahera absorbansvärdet för brunnen med reagensblank från absorbansvärdena som erhållits från kalibrerings-, kontroll- och patientprovsbrunnar. Beräkna genomsnittliga absorbansvärden för dubbla brunnar.
- Dela den specifika antikropps-koncentrationen i IU/ml för serum för kalibrerare nr 3 (som uppges på etiketten) med genomsnittligt absorbansvärde för kalibrerarbrunnar för att erhålla konverteringsfaktor.
- Multiplitera absorbansvärden för vart och ett av proverna med konverteringsfaktorn för att erhålla den specifika antikropps-koncentrationen i IU/ml.
- Den förenklade formen av dessa beräkningar kan uttryckas som:

$$\frac{\text{Nummer 3-kalibrerarvärde (IU/ml)}}{\text{Absorbans av nummer 3-kalibrerare}} \times \text{Absorbans av prov}^* = \text{IU/ml-värde för prov}$$

*Om kalibrerare och prover körs dubbelt, använd genomsnittlig absorbans för dubbla brunnar.

KVALITETSKONTROLL

- Det genomsnittliga absorbansvärdet för nummer 3-kalibrerare måste vara minst 0,400. Absorbansvärden som är mindre än 0,400 indikerar otillräcklig färgutveckling och en ogiltig körning. Otillräcklig färgutveckling beror vanligtvis på användning av kalla reagenser eller felaktig tidsräkning för ett eller flera steg av analysen. Låt reagenserna värmas upp till rumstemperatur (18 till 24°C), och upprepa körningen med speciell uppmärksamhet på tidsberäkningen för alla steg.
- Nollkontrollbrunnen ska ha ett absorbansvärde som är mindre än 0,100. Nollabsorbansvärden som är större än 0,100 indikerar otillräcklig tvättning eller förorening av reagenser och en ogiltig körning.
- Värdena för anti-dsDNA-antikroppar som erhålls för den positiva kontrollen ska vara inom det intervall som indikeras på etiketten. Detta intervall upprättades för att inkludera 95 procent av förväntade värden på grund av statistiskt normal variation. Det kan ibland förväntas små avvikelser utanför dessa intervall. Varje labb ska upprätta sina egna kriterier för accepterande/avslag baserat på dess erfarenhet med den här analysen.
- Prover med specifika antikropps-värden som är större än den övre gränsen på nummer 3-kalibreraren ska rapporteras som större än enhetsvärdet för nummer 3-kalibreraren.
- Kalibrerarkurvan måste plottas för varje körning (eller så måste konverteringsfaktorn beräknas om du använder tillvalet i form av enpunktskalibrering). Användning av en kalibreringskurva eller konverteringsfaktor från en annan körning ogiltigförklarar resultaten.
- Varje labb bör upprätta och upprätthålla sina egna (normala) referensvärden, baserat på patientpopulation och andra lokala faktorer.
- Positivt kontrollserum är ett humanserum som innehåller antikroppar mot dsDNA. Detta är en kvalitativ kontroll som bör ge ett värde på mer än 50 IU/ml.

8. Negativt kontrollserum är en pool med humanserum som inte innehåller antikroppar mot dsDNA. Den här kontrollen bör ge värden som är mindre än 50 IU/ml.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

Nivåerna med antikroppar mot dsDNA har visat sig stiga och falla med sjukdomsförloppet, men den kliniska betydelsen av en enda antikropps nivå studeras fortfarande (20). De enhetsvärden som erhålls i denna analys är endast utformade för att åtskilja patienter i följande breda grupper. Patientprovbrunnar med beräknade värden som är större än eller lika med 50 IU/ml anses vara positiva. Patientprovbrunnar med beräknade värden som är mindre än 50 IU/ml anses vara negativa. Varje laboratorium måste upprätta sitt eget referensintervall och sina egna gränsvärden baserade på den patientpopulation som testas. Enhetsvärden påverkas av patientfaktorer, mekaniska hänsynstaganden (t.ex. pipetteringsprecision och noggrannhet), och analysförhållanden (t.ex. temperatur och tidsberäkning för stegen.) Seriella fastställanden av antikropps nivåer på en patient kan indikera höjning eller sänkning av antikropps nivåer.

RAPPORTERING AV RESULTAT

Resultat ska rapporteras som positiva eller negativa för antikroppar mot dsDNA, med IU/ml-värdet. De antikropps nivåer som finns i ett enda prov har begränsad klinisk betydelse. Seriella avgöranden av antikropps nivåer på en patient kan indikera stigning eller fall för antikropps nivåer, som har visat sig följa sjukdomsförloppet (20).

ANALYSBEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart baserat på identifiering av anti-dsDNA-antikroppar. Läkaren måste tolka dessa resultat tillsammans med patientens historia och symtom, fysiska resultat och andra diagnostiska procedurer.
2. Behandling ska inte initieras endast på grund av ett positivt test för anti-dsDNA-antikroppar. Kliniska indikationer, andra laboratorieresultat och läkarens kliniska intryck måste tas hänsyn till innan behandling initieras.
3. Vissa läkemedel, inklusive procainamid och hydralazin, kan inducera en lupus erythematosus-liknande sjukdom. Patienter med läkemedelsinducerad LE kan påvisa positiva ANA som vanligtvis riktas mot nukleära histoner, även om antikropp mot dsDNA också har rapporterats (21-23).
4. Även om en högtitrerad anti-dsDNA med stort förtroende kan indikera SLE, ska det inte anses vara diagnostiskt utan istället en del av den totala kliniska historien för en patient. Låga titer med dsDNA-antikroppar finns ofta med i serum för patienter med reumatoid artrit, Sjögrens syndrom, progressiv systemisk skleros, dermatomyosit, skivformig lupus erythematosus och blandad bindvävssjukdom (13).
5. Patienter som genomgår steroidbehandling kan ha negativa resultat för dsDNA-antikropp (24).
6. Resultaten av detta test ska användas i samband med information som finns tillgänglig från den kliniska utvärderingen och andra diagnostiska procedurer för att avgöra patientens kliniska status.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det förväntade värdet i den normala populationen är negativt (mindre än 50 IU/ml) vid en utspädning som är 1:40. I patienter med systemisk lupus kan upp till 70 procent visa anti-dsDNA-antikroppar (25). Vissa läkemedel kan inducera produktion av dsDNA-antikroppar (23).

PRESTANDAEGENSKAPER

Testsystemet RELISA® för anti-dsDNA-ES från Immuno Concepts jämfördes med ett annat IgG anti-dsDNA EIA-testsystem med förhöjd specificitet som distribueras kommersiellt. Den population som studerades bestod av 41 prover som var positiva för dsDNA på prediktionsutrustningen, 42 prover som var negativa för dsDNA på prediktionsutrustningen och 204 vanliga blodprov givare. Alla prover testades parallellt på predikatenheten och patientenheten. Baserat på denna jämförelse erhöles följande data med flerpunktskalibreringsmetoden:

		Predikerat anti-dsDNA-test	
		Positivt	Negativt
Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA-ES	Positivt	34	9
	Negativt	7	237

Dessa data gav följande statistik: positivt avtal, 82,9%, en negativ avtal, 96,3%, och övergripande överenskommelse, 94,4%.

Vid testning av samma prov, erhöles följande data med enpunktskalibreringsmetoden som är tillval:

		Predikterat anti-dsDNA-test	
		Positivt	Negativt
Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA-ES	Positivt	36	11
	Negativt	5	235

Dessa data gav följande statistik: positivt avtal, 87,8%, en negativ avtal, 95,5%, och övergripande överenskommelse, 94,4%.

Normal intervall: Serumprover från 205 friska blodgivare testades med Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA-ES testsystem. Endast en (0,5%) av dessa prover hade ett större värde än 50 IU / ml för anti-dsDNA-antikroppar.

KLINISK SPECIFICITET

Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA-ES testsystem användes för att testa serumprover från 40 patienter som sågs för reumatologiska rådfråga. Denna patientgrupp valdes på grund av kliniska reumatiska sjukdomar, men inte för något speciellt sjukdomstillstånd. I denna population prover var ingen positiv för anti-dsDNA-antikroppar.

KLINISK KÄNSLIGHET

Serumpreparat från 45 patienter med SLE testades med testsystemet RELISA® för anti-dsDNA-ES från Immuno Concepts. Fyra (8,9 %) av dessa prover var positiva för anti-dsDNA-antikroppar.

REPRODUCERBARHET

Precisionen för analysen uppmättes med tre prover som hade anti-dsDNA-värden i den linjära delen av kalibreringskurvan. Dessa prover kördes 20 gånger på tre olika lotnummer med antigenbestrukna mikrobunnsremсор i en testhändelse av en teknolog. Precisionen inom analys och mellan analyser visas i följande tabeller:

PRECISION INOM ANALYS

n=20	Genomsnitt (IU/ml)	Standardavvikelse%	Aktuellt värde
Prov 1	316	11	3
Prov 2	115	6	5
Prov 3	97	10	10

PRECISION MELLAN ANALYSER

n=60	Genomsnitt (IU/ml)	Standardavvikelse%	Aktuellt värde
Prov 1	361	37	10
Prov 2	135	18	13
Prov 3	103	12	12

VALIDERING AV ENPUNKTSKALIBRERING

Användning av en enpunktskalibrerare validerades med samma panel med 287 serum som användes för jämförelse med predikatenheten. Regressionsanalys av den här jämförelsen visade en regressionskoefficient (r^2) på 98,3%. Från en praktisk synpunkt såg vi i den här jämförelsen endast tre prover (1,0 %) som visade diagnostiska avvikelser mellan fyrapunktskalibreringssystemet och enkelpunktskalibreringssystemet som är ett tillval. Alla dessa prover hade anti-dsDNA IU/ml-värden som låg nära avgränsningen på 50 IU/ml, som föll mellan 39 och 65 IU/ml. Den här typen av prov är ett diagnostiskt problem i alla analysystem, och måste övervägas noga av de laboratorieyrkespersoner som analyserar proverna och tolkar data.

KORSREAKTIVITETSSTUDIER

Sammanlagt 17 serum som innehöll autoantikroppar inklusive Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och Jo-1 testades med testsystemet RELISA® anti-dsDNA från Immuno Concepts. Ingen av dessa autoantikroppar framställde ett positivt resultat i testsystemet RELISA® anti-dsDNA-ES från Immuno Concepts.

BIBLIOGRAFI

1. Isenberg, D. and Smeenk, R. Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now? *Lupus*, 2002, **11**: 797-800.
2. Ceppellini, R., Polli, E., and Celada, F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus difusus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, **96**: 572-574.
3. Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism*, 1982, **25**: 1271-1277.
4. Riboldi, P., Gerosa, M., Moroni, G., et al. Anti-dsDNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity*, 2005, **38**: 39-45.
5. Werle, E., Blazek, F., and Fiehn, W. The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay, and a *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *Lupus*, 1992, **1**: 369-377.
6. Smeenk, R., van der Lelij, G., and Aarden, L. Measurement of low avidity anti-dsDNA by the *Crithidia luciliae* test and the PEG assay. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, **49**: 603-610.
7. Isenberg, D. Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus? *Lupus*, 2004, **13**: 881-885.
8. Nossent, H. C. and Rekvig, O. P. Is closer linkage between systemic lupus erythematosus and anti-double-stranded DNA antibodies a desirable and attainable goal? *Arthritis Res. Ther.*, 2005, **7(2)**: 85-87.
9. Jaekel, H. P. Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus*, 2006, **15**: 335-345.
10. Renaudineau, Y., Croquefer, S., Jousse, S., et al. Association of alpha-actinin-binding anti-dsDNA antibody with lupus nephritis. *Arthritis Rheumatism*, 2006, **54**, 2523-2532.
11. Data on file, Immuno Concepts. N.A., Ltd.
12. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
13. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
14. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 6:131-140, 1976.
15. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmuno-electrophoretic Method. *Clin. Exp. Immunol.* 22:9-15, 1975.
16. Wold, R. T., Young, F. E., Tan, E. M., et al. Deoxyribonucleic Acid Antibody: A Method to Detect its Primary Interaction With Deoxyribonucleic Acid. *Science* 161:806-807, 1968.
17. Ginsberg, B., Keiser, H. A Millipore Filter Assay for Antibodies to Native DNA in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 16:199-207, 1973.
18. Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmuno-electrophoresis. *Clin. Exp. Immunol.* 17:209-218, 1974.
19. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. *Arth. Rheum.* 20:811-814, 1977.
20. Kavanaugh, A.F., Solomon, D.H., et al. Guidelines for Immunologic Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: Anti-DNA Antibody Tests. *Arthritis Care Res.* 47:546-555., 2002.
21. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. *J. Rheum.* 2:215-220, 1975.
22. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. *J. Rheum.* 2:167-171, 1975.
23. Vedove, C.D., Giglio, M.D., Schena, D., et al. Drug-induced Lupus Erythematosus. *Arch. Dermatol. Res.* 301:99-105, 2009.
24. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. *Arthritis Rheum.* 22:321-328, 1979.
25. Egner, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J. Clin. Pathol.* 53:424-432, 2000.

Om det skulle uppstå skada i skyddsförpackningen, kontakta Immuno Concepts före användning.



Tillverkare



Auktoriserad representant i EU+++



Temperaturgräns



Innehåller tillräckligt för <n> tester



Läs Bruksanvisning



In Vitro Diagnostic Medical Device+++



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Tyskland



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA, USA 95827
Teknisk support USA: 1.800.251.5115 Utanför USA: 1.916.363.2649
E-post: technicalsupport@immunoconcepts.com

Kat 7096-18-I,

4.11.02.003.125-Sv

Rev 1.0 © Copyright 2011

IVD-direktiv (2001/59/EC) Farobeteckningar



REF 7035: Substratlösning

R23/24/25	Giftigt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
R39/23/24/25	Giftigt: risk för mycket allvarliga bestående skador vid inandning, hudkontakt och förtäring.
S1/2	Förvaras inlåst och utom räckhåll för barn.
S7	Förpackningen förvaras väl tillsluten.
S36/37	Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar.
S45	Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

TESTPROCEDUR FÖR RELISA® ANTI-DSDNA-ES

Alla prover, reagenser (inklusive tvättbuffertlösningen) och mikrobrunnar måste vara vid rumstemperatur före användning.

- FÖRBERED ARBETSBLAD**

Märk arbetsbladet som ingår i satsen för att indikera placeringen av proverna i mikrobrunnarna. Analysera kalibrerarna dubbelt. Innan det går att använda flerpunktskurvan måste alla fyra kalibreringsserum köras. För den enpunktskalibreringsmetod som finns som tillval, kör endast nummer 3-kalibreringsserum dubbelt. En brunn används som reagensblank. Vi rekommenderar att varje kontroll och patientprov analyseras dubbelt tills det har upprättats en acceptabel precision för analysen i ditt laboratorium.
- Preparera tvättbuffertlösning**

Kombinera hela innehållet i en flaska med tvättbuffertkoncentrat i 900 ml med avjonserat eller destillerat vatten. Blanda väl. Tvättbuffertlösningen kan täckas över och förvaras vid 2-25 °C i upp till fyra veckor.
- SPÅD UT PATIENTPROVER**

Spåd ut patientprover 1:40 genom att tillsätta 25 µl med serum i 975 µl med provspädningsmedel. Blanda väl. Kalibrerarna, den positiva kontrollen och den negativa kontrollen tillhandahålls vid arbetsutspädning och behöver ingen ytterligare utspädning.
- FÖRBERED MIKROBRUNNAR**

Ta ut det antal mikrobrunnarsremсор som behövs ur påsen. Mikrobrunnarna måste sitta ordentligt fast i ramhållaren. Tryck med ett fast tag ner på båda ändar av remsorna så att de snäpps säkert fast i ramhållaren. Om du använder enstaka brunnar eller mindre än en hel remsa med brunnar, se till att varje brunn sitter fast ordentligt. Brunnar som sitter fast ordentligt i ramhållaren faller inte ut när ramhållaren vänds upp och ner. Oanvända remsor kan läggas tillbaka i foliepåsen, förseglas med dragkedjeförsegling och kylas i upp till 45 dagar.
- DISPENSERA SERUMSPÄDNINGAR**

Dispensera 100 µl med kalibrerare, kontroller och utspädda patientprover i lämpliga brunnar så som beskrivs på arbetsbladet. Dispensera 100 µl med provspädning i brunnen för reagensblank.
- INKUBERINGSREMSOR** (30 minuter vid rumstemperatur, dvs. 18 till 24 °C)

Inkubera vid rumstemperatur i 30 minuter. Under inkuberingen ska remsor skyddas från drag och/eller temperaturväxlingar. Om så önskas går det att täcka över remsorna med genomskinlig tejp eller hushållspapper för att skydda dem mot damm eller andra främmande kroppar.
- TVÄTTA REMSOR** (Se anmärkningar 5 och 6 under allmänna procedurer)

Tvätta brunnarna tre till fem gånger med tvättbuffertlösning. För manuell tvättning, aspirera innehållet i brunnarna och fyll sedan varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik förorening av brunnar, i synnerhet i den första tvätten efter aspireringen. Töm ut all tvättbuffert från brunnarna genom att vända dem upp och ner och skaka sedan av resterande tvättbuffert från brunnarna med en skarp "snäppande" rörelse av handleden. Upprepa stegen för påfyllnad och tömning under sammanlagt tre till fem tvättar. Brunnarna ska sedan knackas med stor kraft på en bit hushållspapper eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av resterande tvättbuffert.
- DISPENSERA ENZYMANTIKROPPSREAGENS**

Dispensera 100 µl med enzymantikroppsreagens i var och en av brunnarna.
- INKUBERINGSREMSOR** (30 minuter vid rumstemperatur, dvs. 18 till 24 °C)

Inkubera vid rumstemperatur i 30 minuter. Under inkuberingen ska remsor skyddas från drag och/eller temperaturväxlingar. Om så önskas går det att täcka över remsorna med genomskinlig tejp eller hushållspapper för att skydda dem mot damm eller andra främmande kroppar.
- TVÄTTA REMSOR**

Tvätta brunnarna tre till fem gånger med tvättbuffertlösning. För manuell tvättning, aspirera innehållet i brunnarna och fyll sedan varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik förorening av brunnar, i synnerhet i den första tvätten efter aspireringen. Töm ut all tvättbuffert från brunnarna genom att vända dem upp och ner och skaka sedan av resterande tvättbuffert från brunnarna med en skarp "snäppande" rörelse av handleden. Upprepa stegen för påfyllnad och tömning under sammanlagt tre till fem tvättar. Brunnarna ska sedan knackas med stor kraft på en bit hushållspapper eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av resterande tvättbuffert.
- DISPENSERA SUBSTRATLÖSNING**

Använd en timer för att säkerställa konsekventa intervall och dispensera 100 µl med substratlösning i var och en av brunnarna. Substratlösningen måste tillsättas i brunnarna med en stadig hastighet så att varje brunn inkuberas under exakt samma tid (30 minuter). Substratlösningen i brunnar som inkuberas med positiva prover blir blå och lösningen i brunnar som inkuberas med negativa prover blir färglös eller mycket ljusblå.
- INKUBERA REMSOR** (exakt 30 minuter vid rumstemperatur, dvs. 18 till 24 °C)

Inkubera vid rumstemperatur i exakt 30 minuter. Under inkuberingen ska remsor skyddas från drag och/eller temperaturväxlingar.
- DISPENSERA STOPPREAGENS**

Efter det att den första brunnen har inkuberats under exakt 30 minuter, tillsätt 100 µl med stoppreagens i varje brunn, i samma ordning och med samma hastighet som substratlösningen tillsattes i brunnarna. Vid tillägg av stoppreagens blir den blå substratlösningen gul och den färglösa lösningen förblir färglös.
- AVLÄS ABSORBANS I BRUNNAR**

Inom 30 minuter efter tillsättningen av stoppreagens måste brunnar avläsas i en plattavläsande spektrofotometer. Brunnar avläses vid 450 nm mot brunnen med blankkontroll. Om en spektrofotometer med dubbel våglängd finns tillgänglig, ska våglängden för referensfiltret anges till 600-650 nm. Avläsning av mikrobrunnarna vid 450 nm utan referensfilter leder till högre absorbansvärden.

FÖR TEKNISK HJÄLP:

USA: 1-800-251-5115 Utanför USA: 1-916-363-2649
E-post: technicalsupport@immunoconcepts.com

