

TEST RELISA® PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-dsDNA
Per uso diagnostico in vitro
Per uso professionale
Numeri di catalogo: 7096-17 (96 pozzetti) e 7696-17 (576 pozzetti)

USO PREVISTO: *il test in oggetto è un sistema di analisi a dosaggio immunoenzimatico (EIA - Enzyme Immuno Assay) per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA nel siero umano. Questo sistema di analisi deve essere utilizzato a supporto della diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES).*

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE SUL TEST

I pazienti con LES possono produrre anticorpi a numerosi antigeni nucleari, ma gli anticorpi anti-Sm (antigene Smith) e il DNA a doppio filamento (dsDNA) sono quelli che dimostrano la maggiore correlazione con la malattia (1). Gli anticorpi anti-Sm mostrano un pattern ANA di tipo punteggiato, mentre gli anticorpi diretti contro il dsDNA evidenziano generalmente un pattern ANA omogeneo. Sebbene nel siero dei pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiosite, lupus eritematoso discoide e connettivite mista (2) possano essere presenti bassi livelli di anticorpi anti-dsDNA, questi sono rilevabili in grado elevato quasi esclusivamente nel LES. Si ritiene, inoltre, che gli anticorpi anti-dsDNA, quando depositati sotto forma di immunocomplessi (3), siano coinvolti nella patogenesi delle varianti più severe di lupus. Gli anticorpi anti-dsDNA, pertanto, sono presenti con un titolo elevato e poiché hanno una correlazione con l'attività di malattia (4), il loro rilevamento è importante per la gestione dei pazienti con LES.

Gli anticorpi anti dsDNA possono essere rilevati attraverso numerosi test. I metodi usati con maggiore frequenza comprendono l'immunofluorescenza, la radioimmunoanalisi, la controimmuno-elettroforesi e l'immundiffusione (5-8). Il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA è un saggio immunoenzimatico (EIA, *Enzyme Immunoassay*) che rileva gli anticorpi anti-dsDNA presenti nel siero.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test in oggetto è un saggio immunoenzimatico (EIA - *Enzyme Immunoassay*) indiretto. In questo sistema di analisi, la superficie dei micropozzetti è stata rivestita con preparazioni stabilizzate dell'antigene dsDNA che è utilizzato come antigene di substrato. I campioni diluiti prelevati dal paziente sono dispensati nei micropozzetti e incubati lasciando reagire gli anticorpi del campione con l'antigene della fase solida. Dopo il lavaggio per la rimozione dell'anticorpo non legato e delle altre proteine del siero, i pozzetti sono incubati con anticorpi anti-umani coniugati con perossidasi di rafano. Il preparato di anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano incluso nel sistema di analisi è specifico per le catene gamma della IgG umana.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo coniugato con perossidasi di rafano, in presenza di risultati positivi si produce un complesso stabile in tre parti: questo complesso è composto dall'anticorpo anti-umano coniugato con la perossidasi di rafano legante l'anticorpo anti ds-DNA che è legato all'antigene stabilizzato sulla superficie di plastica.

Dopo un'ulteriore fase di lavaggio, il complesso viene rilevato aggiungendo una soluzione di tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ come substrato cromogenico. Il grado di sviluppo del colore in ciascun pozzetto è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi anti-dsDNA in ciascun campione di siero. Ciascun micropozzetto è letto in uno spettrofotometro a 450 nm.

COMPONENTI DEL SISTEMA – MATERIALI FORNITI

Conservazione: tutti i componenti devono essere conservati in frigo ad una temperatura compresa tra 2 e 10° C. Non congelare.



Stabilità: tutti i componenti rimangono stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare nessuno dei componenti dopo la data di scadenza.



REAGENTI REATTIVI

Strisce di micropozzetti rivestiti con dsDNA [PLATE]: n. di catalogo 7008-17. Piastra con dodici strisce, ciascuna contenente otto pozzetti rivestiti con dsDNA. Se il test necessita di un numero di pozzetti inferiore a otto, i pozzetti possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere reintrodotte nel sacchetto con l'essiccante dotato di una chiusura sigillante a zip e conservate in frigo fino ad un massimo di 45 giorni.

Diluyente per campioni [SOLN|DIL]: n. di catalogo 7100 (100 ml). Diluyente per campioni tamponato proprietario, utilizzato per la diluizione dei campioni prelevati dal paziente.

Reagente anticorpo enzimatico specifico per IgG umana (catena gamma) [CONJ|HRP]: n. di catalogo 7009-17 (14 ml). IgG anti-umana (specifico per la catena gamma) coniugata con perossidasi di rafano (HRP). Reagente pronto per l'uso.

Soluzione di substrato [SOLN|SUB]   : n. di catalogo 7035 (14 ml). Soluzione di substrato enzimatica HRP-specifica contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e perossido d'idrogeno (H₂O₂). Reagente pronto per l'uso. **ATTENZIONE:** Infiammabile. Questo reagente contiene meno del 25% di metanolo e acetone. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

Reagente bloccante [SOLN|STOP]   : n. di catalogo 7033 (14 ml). Reagente bloccante proprietario per i test EIA della Immuno Concepts. Reagente pronto per l'uso. **PERICOLO:** agente corrosivo. Questo reagente contiene acido solforico e acido cloridrico (meno del 3% ciascuno in volume) e deve essere maneggiato con cautela. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

Controllo positivo con anticorpi anti-dsDNA [CONTROL|+]: n. di catalogo 7021-17 (2 ml). Siero umano di controllo positivo contenente anticorpi anti-dsDNA. Questo siero è fornito alla diluizione di lavoro ed è pronto per l'uso. Per il range stabilito in UI/ml (Unità internazionali/ml) vedere l'etichetta.

Controllo negativo [CONTROL|-]: n. di catalogo 7031 (2 ml). Siero umano di controllo negativo che non contiene anticorpi anti-dsDNA. Questo siero è fornito alla diluizione di lavoro ed è pronto per l'uso.

Sieri di calibrazione 1-4 con anticorpi anti-ds DNA [CAL]: numeri di catalogo 7261-17, 7262-17, 7263-17, 7264-17, (1,5 ml ciascuno). Siero calibratore umano contenente anticorpi anti-dsDNA. Questo siero è fornito alla diluizione di lavoro ed è pronto per l'uso. Il calibratore 3 può essere utilizzato come calibratore a punto singolo. I sieri di calibrazione sono stati testati con OMS Wo80 preparazione riferimento per determinare la concentrazione di anticorpi in Unità Internazionali / ml (UI / ml). Vedi etichette dei flaconi per dsDNA anticorpi anti-concentrazione in IU / ml.

COMPONENTI NON REATTIVI

Supporto per micropozzetti

Soluzione tampone di lavaggio

Tampone PBS [PWDR|PBS]: n. di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ogni busta contiene una quantità di polvere tamponata sufficiente ad ottenere 1 litro di soluzione tampone di lavaggio (nei kit completi per l'analisi, per ciascuna piastra da 96 micropozzetti sono fornite due buste di polvere tamponata).

Concentrato per tampone di lavaggio [SOLN|WASH]: n. di catalogo 1031 (10 ml). Soluzione Tween 20 al 5% da utilizzare nel tampone di lavaggio (nei kit completi per l'analisi, per ciascuna piastra da 96 micropozzetti sono fornite due fiale di concentrato per tampone).

Preparazione: sciogliere il contenuto di una busta della polvere per tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato per tampone di lavaggio al PBS sciolto. Mescolare bene e tenere alla di 2-25°C fino a 4 settimane o fino a che non si presentino segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili. Prima dell'uso, la soluzione tampone di lavaggio deve essere a temperatura ambiente (18-25°C).

Uso previsto: tutti i componenti sono forniti pronti per l'uso senza necessità di aliquotazione o ricostituzione (con l'eccezione del tampone PBS che deve essere disciolto in acqua distillata o deionizzata prima dell'utilizzo).

Stabilità: tutti i componenti rimangono stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare nessuno dei componenti dopo la data di scadenza.

ALTRO MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

Pipette volumetriche di precisione per la dispensazione di volumi compresi tra 25 e 1000 µl.
Spruzzetta per l'erogazione della soluzione tamponata di lavaggio nei micropozzetti oppure sistema di lavaggio automatico o semi-automatico dei micropozzetti.
Contenitore da un litro per soluzione tampone di lavaggio PBS.
Acqua distillata o deionizzata.
Spettrofotometro per la lettura della piastra con capacità di lettura dell'assorbanza a 450 nm.
Provette per la diluizione del siero.
Carta bibula o salviette assorbenti.
Pipetta multicanale con capacità di dispensazione a 8 pozzetti.
Guanti monouso.
Timer da laboratorio.

PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana utilizzati per questo prodotto sono stati analizzati e sono stati trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi al virus dell'immunodeficienza umana-1 (HIV-1), al virus dell'immunodeficienza umana-2 (HIV-2), al virus dell'epatite C (HCV) e all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con metodologie approvate dalla FDA. Tuttavia, poiché nessun metodo d'analisi può offrire la completa garanzia dell'assenza dei virus HIV-1, HIV-2, dell'epatite C, dell'epatite B o di altri agenti infettivi, tutti i materiali devono essere manipolati nella stessa maniera come materiali potenzialmente infetti.
2. Tutti i sieri di controllo, i sieri di calibrazione e i campioni prelevati dai pazienti devono essere manipolati ad un livello di biosicurezza 2 come raccomandato per qualunque siero umano o campione ematico potenzialmente infetto nel Manuale elaborato dai *Centres for Disease Control/National Institutes of Health, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ed. 1999*.
3. La diluizione dei componenti o la sostituzione degli stessi con altri diversi da quelli forniti con questo sistema d'analisi, può produrre risultati non coerenti.
4. La sodio azide (0,09%) è il conservante utilizzato. Essa può reagire con il piombo o il rame di cui sono composte le condutture idrauliche e formare azoturi metallici esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, pertanto, far scorrere grandi quantità di acqua corrente per impedire il deposito di potenziali residui nelle tubature. La sodio azide è un veleno e se ingerita può essere tossica.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e con le mucose. In caso di contatto, lavare con un sapone germicida e abbondante acqua.
7. Non fumare, mangiare o bere nelle aree destinate alla manipolazione dei campioni o dei reagenti del kit.
8. Evitare sempre spruzzi o la formazione di aerosol.
9. Temperature e tempi d'incubazione diversi da quelli specificati possono produrre risultati errati.
10. La contaminazione crociata dei reagenti o dei campioni può produrre risultati falsi. Durante l'analisi, i campioni devono rimanere all'interno dei micropozzetti.
11. Prima dell'uso la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e accuratamente risciacquata per essere liberata da eventuali tracce di detergente. Prima dell'uso tutta la vetreria deve essere pulita e asciutta.
12. Prima dell'uso portare tutti i reagenti, i micropozzetti e i campioni a temperatura ambiente (18-25° C).
13. Durante la manipolazione dei reagenti e dei campioni indossare guanti monouso e dopo lavare accuratamente le mani.
14. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può produrre risultati falsi.
15. Il reagente bloccante è corrosivo e può causare ustioni. Questo reagente contiene acido solforico e acido cloridrico (meno del 3% ciascuno in volume) e deve essere maneggiato con cautela. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Raccolta: il siero è il campione di preferenza. Prelevare circa 5 ml di sangue intero con tecnica asettica tramite venipuntura utilizzando una provetta di raccolta a vuoto sterile o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente (18-25° C). Appena possibile il siero deve essere separato dal coagulo tramite centrifugazione per ridurre al minimo l'emolisi.

Sostanze interferenti: i sieri che mostrano un grado elevato di emolisi, ittero, lipemia o proliferazione microbica non devono essere utilizzati in quanto queste condizioni possono produrre risultati aberranti. I campioni che contengono particolato visibile devono essere ripuliti tramite centrifugazione prima dell'analisi.

ATTENZIONE: il ripetuto congelamento/scongelamento dei campioni può produrre risultati falsi negativi o falsi positivi.

NOTE PROCEDURALI GENERALI

1. Prima dell'uso è estremamente importante che tutti i componenti del kit e i campioni di siero siano a temperatura ambiente (18-25° C). Per portare alla temperatura di 20° C un intero litro di tampone di lavaggio dopo averlo tolto dal frigorifero, possono essere necessarie molte ore. Temperature d'incubazione superiori o inferiori all'intervallo prestabilito possono produrre risultati inaccurati. Dopo l'uso riporre i campioni e i reagenti non utilizzati in frigo.
2. Mescolare bene i reagenti prima dell'uso, capovolgendo i contenitori con delicatezza. Non far vorticare o scuotere i reagenti. Evitare la formazione di schiuma.
3. Quando si preparano le diluizioni dei campioni, pulire i puntali delle pipette prima di dispensare il siero nel diluente del campione. La presenza di un'eccessiva quantità di campione sulla parte esterna del puntale può alterare i risultati.
4. Si raccomanda l'uso di una pipetta multicanale poiché garantisce tempi di reazione, tempi d'incubazione e una dispensazione del reagente più uniformi.
5. **Un adeguato lavaggio dei pozzetti è estremamente importante.** Pozzetti non adeguatamente lavati mostreranno dei valori di fondo elevati e possono produrre risultati falsi positivi. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con la soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione crociata dei pozzetti, specialmente durante il primo lavaggio eseguito dopo l'aspirazione. Far defluire tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui del tampone scuotendo i pozzetti con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e deflusso del tampone di lavaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere battuti con vigore su della carta assorbente o su altro materiale assorbente per eliminare tutte le tracce del tampone di lavaggio. L'uso di un sistema automatico di lavaggio dei micropozzetti assicura una pulizia adeguata e uniforme ed è pertanto raccomandato.
NOTA: a causa delle diverse tecniche di lavaggio e dei diversi sistemi automatici disponibili, il numero dei lavaggi può essere regolato per ottimizzare i risultati. Ogni laboratorio deve stabilire il numero di lavaggi che garantisca la maggiore efficacia al proprio sistema di lavaggio.
6. Un'inadeguata rimozione dei residui del tampone di lavaggio può causare uno sviluppo non uniforme del colore. Le strisce dei micropozzetti devono essere tamponate sulla carta o sulle salviette assorbenti per ridurre al minimo la presenza dei residui del tampone.
7. La tempistica di tutte le fasi è cruciale. Tutti i campioni di siero devono essere diluiti prima di avviare la procedura e devono essere dispensati nei micropozzetti nel più breve tempo possibile (non più di cinque minuti). Le dimensioni dei lotti devono essere stabilite in modo tale da consentire un'agevole manipolazione del campione entro questo lasso di tempo. L'uso di una pipetta multicanale facilita la manipolazione dei campioni e dei reagenti ed è pertanto raccomandato.
8. Ad eccezione dell'ultima incubazione (soluzione di substrato), l'avvio di ogni fase d'incubazione avviene con il completamento della dispensazione del campione o del reagente. La fase d'incubazione della soluzione di substrato deve durare esattamente 30 minuti per ciascun pozzetto. Tutti i campioni e i reagenti devono essere dispensati nella stessa sequenza temporale e a intervalli regolari.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

CALCOLI

1. Sottrarre il valore dell'assorbanza del pozzetto del reagente in bianco dal valore dell'assorbanza ottenuto per i pozzetti del campione del paziente, della soluzione di controllo e standard. Calcolare i valori medi dell'assorbanza per i pozzetti in duplicato.
2. Segnare il valore medio di assorbanza di ciascun siero di calibrazione (da 1 a 4) sul foglio di lavoro della curva di calibrazione del test RELISA® per la determinazione degli anticorpi riportando i valori della densità ottica (o assorbanza) sottratti del bianco sull'asse delle ordinate (y) e il valore in UI/ml riportato in etichetta sull'asse delle ascisse (x). Tracciare una linea di regressione lineare (*best-fit line*) tra i punti del calibratore.
3. Ricavare il valore in UI/ml per ciascun campione del paziente attraverso l'interpolazione dalla linea del calibratore.

4. Qualora si impieghi un software, utilizzare un'elaborazione a 4 parametri con coordinate lin-log per l'assorbanza e la concentrazione e una linea di regressione lineare.

CALIBRAZIONE OPZIONALE A PUNTO SINGOLO

1. Sottrarre il valore dell'assorbanza del pozzetto del reagente in bianco dal valore dell'assorbanza ottenuto per i pozzetti del campione del paziente, della soluzione di calibrazione e di controllo. Calcolare i valori medi dell'assorbanza per i pozzetti in duplicato.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere la concentrazione anticorpale specifica in IU/ml del siero di calibrazione n. 3 (riportata sull'etichetta) per il valore medio dell'assorbanza relativo ai pozzetti della soluzione di calibrazione.
3. Per ottenere la concentrazione anticorpale specifica in UI/ml, moltiplicare i valori dell'assorbanza di ciascun campione per il fattore di conversione.
4. La forma semplificata di questi calcoli può essere espressa come segue:

$$\frac{\text{valore calibratore 3 (UI/ml)}}{\text{Assorbanza calibratore 3}} \times \text{assorbanza del campione}^* = \text{valore UI/ml per campione}$$

*Se i calibratori e i campioni sono analizzati in duplicato, utilizzare il valore medio dell'assorbanza.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

1. Il valore medio dell'assorbanza del calibratore n. 3 deve essere pari ad almeno 0,400. Valori di assorbanza inferiori a 0,400 indicano un inadeguato sviluppo del colore e quindi un'analisi non valida. L'inadeguato sviluppo del colore è spesso causato dall'utilizzo di reagenti freddi o dall'impiego di tempi non corretti in una o più fasi del saggio. Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (18-25° C) e ripetere l'analisi con particolare attenzione alla tempistica di tutte le fasi.
2. Il pozzetto della soluzione di controllo bianco deve avere un valore di assorbanza inferiore a 0,150. Valori d'assorbanza del bianco superiori a 0,150, sono indicativi di un lavaggio inadeguato o di una contaminazione dei reagenti e quindi di un'analisi non valida.
3. I valori degli anticorpi anti-dsDNA ottenuti per il siero di controllo positivo, devono rientrare negli intervalli indicati sull'etichetta. Questo intervallo è stato stabilito per comprendere il 95% dei valori attesi per la variabilità statistica normale. Sono previste altresì piccole deviazioni occasionali al di fuori di questi intervalli. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri criteri di accettabilità/inaccettabilità sulla base della propria esperienza con questo saggio.
4. I campioni con valori anticorpali specifici oltre il limite superiore del calibratore n. 3 devono essere descritti come recanti valori superiori ai valori in unità del calibratore n. 3.
5. La curva di calibrazione deve essere tracciata per ogni sessione di analisi (oppure, qualora si stia utilizzando la calibrazione opzionale a punto singolo, è necessario calcolare il fattore di conversione). L'utilizzo di una curva di calibrazione o di un fattore di conversione derivato da un'altra sessione di analisi invaliderà i risultati.
6. Ciascun laboratorio deve stabilire e mantenere il proprio intervallo di valori di riferimento (range di normalità) sulla base della propria popolazione di pazienti e di altri fattori locali.
7. Il siero di controllo positivo è un siero umano contenente anticorpi anti-dsDNA. Questo è un controllo di tipo qualitativo che deve produrre un valore superiore a 35 UI/ml.
8. Il siero di controllo negativo è un siero umano che non contiene anticorpi anti-dsDNA. Questo controllo deve produrre risultati inferiori a 35 UI/ml.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

I livelli degli anticorpi anti-DNA hanno dimostrato di salire e scendere nel decorso della malattia, ma il significato clinico del livello di un singolo anticorpo è ancora in fase di studio (13). I valori in Unità rilevati con questo saggio sono finalizzati semplicemente a suddividere i pazienti nelle ampie categorie descritte di seguito: i pozzetti del campione del paziente che hanno prodotto valori superiori o pari a 35 UI/ml sono considerati positivi, mentre i pozzetti del campione del paziente che hanno prodotto valori inferiori a 35 UI/ml sono considerati negativi. Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento e i valori di cut-off sulla base della propria popolazione di pazienti esaminati. I valori in Unità sono influenzati dai fattori che riguardano il paziente, da considerazioni di tipo meccanico (ad esempio l'accuratezza e la precisione della pipettatura) e dalle condizioni del saggio (ad esempio temperatura e tempo delle fasi). Le determinazioni seriali dei livelli di anticorpi di un paziente possono indicare l'incremento o il calo dei livelli anticorpali.

DEFINIZIONE DEI RISULTATI

I risultati relativi agli anticorpi anti-dsDNA devono essere definiti come positivi o negativi ed espressi in UI/ml. I livelli di anticorpi rilevati in un singolo campione hanno un significato clinico limitato. Le determinazioni seriali dei livelli di anticorpi di un paziente possono indicare l'incremento o il calo dei livelli anticorpali, che ha dimostrato di seguire il decorso della malattia (13).

LIMITI DEL TEST

1. La diagnosi non può essere effettuata sulla base del solo rilievo degli anticorpi anti-dsDNA. Il medico deve interpretare tali risultati congiuntamente all'anamnesi del paziente e alla sua sintomatologia, ai reperti di carattere obiettivo e agli esiti delle altre procedure diagnostiche.
2. La terapia non deve essere avviata unicamente sulla base della positività del test degli anticorpi anti-dsDNA. Prima di iniziare la terapia, è necessario prendere in considerazione le indicazioni cliniche, altri risultati di test di laboratorio e la valutazione clinica del medico.
3. Determinati farmaci tra cui la procainamide e l'idralazina, possono indurre l'insorgenza di una sindrome lupus-simile. I pazienti con tale sindrome possono evidenziare una positività ANA solitamente diretta contro gli istoni nucleari, sebbene in questi soggetti sia stata rilevata anche la presenza di anticorpi anti-dsDNA (9-10, 14).
4. Nonostante livelli elevati di anticorpi anti-dsDNA siano altamente suggestivi di un LES, a questi non deve essere attribuito un valore diagnostico quanto piuttosto un ruolo nella storia clinica complessiva del paziente. Bassi livelli di anticorpi anti-dsDNA possono essere presenti anche nel siero dei pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, dermatomiosite, lupus eritematoso discoide e connettivite mista (2).
5. I pazienti sottoposti a terapia cortisonica possono produrre risultati negativi per gli anticorpi anti-dsDNA (11).
6. I risultati di questo test devono essere utilizzati insieme alle informazioni relative alla valutazione clinica del caso e ad altre procedure diagnostiche per determinare la condizione clinica del paziente.

RISULTATI PREVISTI

Il valore previsto per la popolazione normale è negativo (inferiore a 35 UI/ml). Nei pazienti con LES, gli anticorpi anti-dsDNA possono essere rilevati finanche nel 70% dei casi (15). Determinati farmaci possono indurre la produzione di anticorpi anti-dsDNA (14).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA della Immuno Concepts è stato comparato con un altro test EIA per il rilevamento degli anticorpi anti-dsDNA IgG reperibile in commercio. La popolazione studiata consisteva di 108 campioni sono risultati positivi per dsDNA normale e 100 campioni di donatori di sangue che sono stati testati in parallelo sul dispositivo predicato e il dispositivo soggetto. Sulla base di questo confronto, i seguenti dati sono stati ottenuti utilizzando il punto di calibrazione multi-metodo:

Test di comparazione Test per la determinazione degli anticorpi IgG anti-dsDNA		
	Positivo	Negativo
Test RELISA® per il rilevamento degli anticorpi anti-dsDNA Immuno Concepts	105	6
	3	94

Questi esiti producono i seguenti risultati statistici: accordo positivo, 97,2%; accordo negativo, il 94,0%, e un accordo globale, 95,7%.

Sulla base di questo confronto, utilizzando il metodo a punto singolo sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Test di comparazione Test per la determinazione degli anticorpi IgG anti-dsDNA		
	Positivo	Negativo
Test RELISA® per il rilevamento degli anticorpi anti-dsDNA Immuno Concepts	103	5
	5	95

Questi esiti producono i seguenti risultati statistici: accordo positivo, 95,4%; accordo negativo, il 95,0%, e un accordo globale, 95,2%.

Range normale: Il range normale per questo dosaggio è stata determinata analizzando campioni di siero da 261 donatori di sangue sani. Solo due di questi campioni avevano valori superiori a 35 UI / ml per gli anticorpi anti-dsDNA.

SPECIFICITÀ CLINICA

Utilizzando il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA della Immuno Concepts sono stati analizzati i campioni di siero ottenuti da 117 pazienti sottoposti ad una valutazione di tipo reumatologico. Questa popolazione è stata selezionata a causa dell'evidenza clinica di patologie reumatiche, ma non per qualsivoglia specifico stato di malattia. Quattro (3,4%) di questi campioni si sono dimostrati positivi per gli anticorpi anti-dsDNA.

SENSIBILITÀ CLINICA

Utilizzando il Test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA della Immuno Concepts, sono stati analizzati i campioni di siero prelevati da 39 pazienti con LES. Otto (20,5%) di questi campioni si sono dimostrati positivi per gli anticorpi anti-dsDNA.

RIPRODUCIBILITÀ

La precisione del dosaggio è stata determinata utilizzando 3 campioni che avevano valori di anticorpi anti-dsDNA nella porzione lineare della curva di calibrazione. Questi campioni sono stati analizzati 20 volte su tre diversi lotti di strisce di micropozzetti rivestiti con antigene in una stessa seduta analitica da uno stesso analista. La precisione intra- e inter-saggio è riportata nelle seguenti tabelle:

PRECISIONE INTRA-SAGGIO

n=20	Media (UI/ml)	D.S.	%C.V.
Campione 1	610	14	2
Campione 2	315	14	5
Campione 3	114	10	9

PRECISIONE INTER-SAGGIO

n=60	Media (UI/ml)	D.S.	%C.V.
Campione 1	601	24	4
Campione 2	329	16	5
Campione 3	122	11	9

VALIDAZIONE DELLA CALIBRAZIONE A PUNTO SINGOLO

L'uso di un calibratore a punto singolo è stato validato utilizzando la medesima serie di 108 sieri impiegata per la comparazione con il sistema d'analisi di confronto. L'analisi della regressione di questa comparazione ha evidenziato un coefficiente di regressione (r^2) del 97,95%. Da un punto di vista pratico, in questa comparazione abbiamo potuto osservare solamente 3 campioni (2,7%) che evidenziavano discrepanze diagnostiche tra il sistema di calibrazione a quattro punti e il sistema di calibrazione opzionale a punto singolo. Tutti questi campioni avevano dei valori degli anticorpi anti-dsDNA vicini al valore di cut-off di 35 UI/ml ovvero compresi tra 33 e 40 UI/ml. Questo tipo di campione costituisce un problema sotto il profilo diagnostico in ogni sistema di analisi e necessita di essere valutato con attenzione da parte degli addetti al laboratorio che analizzano i campioni e interpretano i dati.

STUDI DI REATTIVITÀ CROCIATA

Utilizzando il test RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA della Immuno Concepts sono stati esaminati in tutto 11 sieri contenenti autoanticorpi tra cui anti-SM RNP, SS-A, SS-B Scl-70 e Jo-1. Nessuno di questi campioni ha prodotto risultati positivi al test Immuno Concepts RELISA® per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
3. 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.
4. 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 Counterimmunoelectrophoretic Method. Clin. Exp. Immunol. 22:9-15, 1975.
5. 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.
6. 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.
7. Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. Clin. Exp. Immunol. 17:209-218, 1974.
8. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
9. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
10. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
11. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.
12. Data on file, Immuno Concepts, N.A., Ltd.
13. 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.
14. Vedove, C.D., Giglio, M.D., Schena, D., et al. Drug-induced Lupus Erythematosus. Arch. Dermatol. Res. 301:99-105, 2009.
15. Egner, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. J. Clin. Pathol. 53:424-432, 2000.

In caso di danni all'imballaggio di protezione, contattare la Immuno Concepts prima dell'uso.



Produttore



Rappresentante autorizzato per la UE



Limite
temperatura



Contenuto sufficiente per n. test



Consultare le
Istruzioni per l'uso



Dispositivo medico diagnostico in vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 7096-17-I,

4.11.02.003.124-It

Rev 2.1 © Copyright 2015

TEST RELISA® PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-dsDNA

Prima dell'uso tutti i campioni, i reagenti (compresa la soluzione tampone di lavaggio) e i micropozzetti devono essere a temperatura ambiente

- 1. PREPARAZIONE DEL FOGLIO DI LAVORO**

Etichettare il foglio di lavoro incluso nel kit per indicare la posizione dei campioni nei micropozzetti. Analizzare il calibratore in duplicato. Per utilizzare la curva a più punti è necessario analizzare tutti i quattro sieri di calibrazione. Per il metodo di calibrazione opzionale a punto singolo, analizzare solamente il siero di calibrazione n. 3 in duplicato. Un pozzetto è utilizzato per il bianco del reagente. Raccomandiamo di analizzare in duplicato ciascun campione del paziente e ciascun controllo fin quando non si è raggiunta un'accettabile precisione dell'analisi all'interno del proprio laboratorio.
- 2. PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE TAMPONE DI LAVAGGIO (PBS-Tween)**

Sciogliere il contenuto di una busta della polvere del tampone PBS in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato per tampone di lavaggio al contenitore da un litro in cui è stato disciolto il tampone PBS. Mescolare bene. La soluzione tampone di lavaggio può essere coperta e conservata a 2-25 °C fino a quattro settimane.
- 3. DILUIZIONE DEL CAMPIONE DEL PAZIENTE**

Diluire il campione del paziente a 1:40 aggiungendo 25 µl di siero a 975 µl di diluente per campioni. Mescolare bene. Il controllo positivo e negativo e il calibratore sono forniti alla diluizione di lavoro e non ne richiedono una ulteriore.
- 4. PREPARAZIONE DEI MICROPOZZETTI**

Estrarre il numero necessario di strisce di micropozzetti dalla busta e collocarle sulla piastra di supporto. I micropozzetti devono essere saldamente collocati sul supporto. Premere con forza su entrambe le estremità delle strisce in modo che si fissino sul supporto. Se si utilizzano micropozzetti singoli o in numero inferiore a quello di una striscia intera, assicurarsi che ciascuno di essi sia stato inserito in maniera ferma sul supporto. I pozzetti che sono stati adeguatamente inseriti non cadono quando il supporto viene capovolto. Se il test necessita di un numero di pozzetti inferiore a otto, i pozzetti possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere reintrodotte nella busta dotata di chiusura sigillante a zip e conservate in frigo fino ad un massimo di 45 giorni.
- 5. DISPENSAZIONE DELLE DILUIZIONI DEL SIERO**

Dispensare 100 µl dei calibratori, dei controlli e dei campioni diluiti del paziente nei pozzetti appropriati, come descritto foglio di lavoro. Dispensare 100 µl del diluente del campione nel pozzetto bianco del reagente.
- 6. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente ovvero 18-25 °C)**

Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Se si vuole, le strisce possono essere coperte con della pellicola trasparente o delle salviette di carta per proteggerle dalla polvere e da altri corpi estranei.
- 7. LAVAGGIO DELLE STRISCE (vedere la Note procedurali generali 5 e 6)**

Lavare i pozzetti 3-5 volte con la soluzione tampone di lavaggio PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con la soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione crociata dei pozzetti, specialmente durante il primo lavaggio eseguito dopo l'aspirazione. Far defluire tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui del tampone scuotendo i pozzetti con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e deflusso del tampone di lavaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere battuti con vigore su della carta assorbente o su altro materiale assorbente per eliminare tutte le tracce del tampone di lavaggio.
- 8. DISPENSAZIONE DEL REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO**

Dispensare 100 µl del reagente anticorpo enzimatico in ciascuno dei pozzetti.
- 9. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (30 minuti a temperatura ambiente ovvero 18-25 °C)**

Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura. Se si vuole, le strisce possono essere coperte con della pellicola trasparente o delle salviette di carta per proteggerle dalla polvere e da altri corpi estranei.
- 10. LAVAGGIO DELLE STRISCE**

Lavare i pozzetti 3-5 volte con la soluzione tampone di lavaggio PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con la soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione crociata dei pozzetti, specialmente durante il primo lavaggio eseguito dopo l'aspirazione. Far defluire tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui del tampone scuotendo i pozzetti con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e deflusso del tampone di lavaggio per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere battuti con vigore su della carta assorbente o su altro materiale assorbente per eliminare tutte le tracce del tampone di lavaggio.
- 11. DISPENSAZIONE DELLA SOLUZIONE DI SUBSTRATO**

Usando un timer per garantire l'uniformità degli intervalli di tempo, dispensare 100 µl della soluzione di substrato in ciascuno dei pozzetti. La soluzione di substrato deve essere aggiunta ai pozzetti ad intervalli regolari in modo che ogni pozzetto sia incubato esattamente per il medesimo tempo (30 minuti). La soluzione di substrato dei pozzetti incubati con campioni positivi si colorerà di blu, mentre la soluzione dei pozzetti incubati con campioni negativi sarà incolore o assumerà una colorazione blu molto chiaro.
- 12. INCUBAZIONE DELLE STRISCE (esattamente 30 minuti a temperatura ambiente ovvero 18-25 °C)**

Incubare a temperatura ambiente per esattamente 30 minuti. Durante l'incubazione le strisce devono essere protette da correnti d'aria o variazioni di temperatura.
- 13. DISPENSAZIONE DEL REAGENTE BLOCCANTE**

Dopo che il primo pozzetto è stato incubato esattamente per 30 minuti, aggiungere 100 µl del reagente bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e ai medesimi intervalli di tempo della soluzione di substrato. Al momento dell'aggiunta del reagente bloccante, la soluzione di substrato blu virerà al giallo e la soluzione incolore resterà tale.
- 14. LETTURA DELL'ASSORBANZA DEI POZZETTI**

Entro 30 minuti dall'aggiunta del reagente bloccante i pozzetti devono essere letti in uno spettrofotometro per la lettura della piastra. I pozzetti sono letti a 450 nm rispetto al pozzetto del bianco del reagente. Se è disponibile uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda, la lunghezza d'onda per il filtro di riferimento deve essere di 600-650 nm. La lettura dei micropozzetti a 450 nm senza un filtro di riferimento produrrà valori di assorbanza più elevati.

PER ASSISTENZA TECNICA CONTATTARE:
USA: 1-800-251-5115 Fuori degli USA: 1-916-363-2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com