

RELISA® dsDNA-TESTSYSTEM

Nur zur in vitro-Diagnostik

Für den professionellen Gebrauch

Katalognummer: 7096-17 (96 Kavitäten) und 7696-17 (576 Kavitäten)

VERWENDUNGSZWECK: Bei diesem Produkt handelt es sich um ein Enzym-Immuntestsystem zum Nachweis von Antikörpern gegen dsDNA in humanem Serum. Die mit diesem Testsystem erzielten Ergebnisse können zur Einschätzung der Diagnose von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes herangezogen werden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) können eine Reihe von Antikörpern gegen nukleäre Antigen entwickeln, jedoch weisen Antikörper gegen Sm (Smith Antigen) und Doppelstrang-DNA (dsDNA) die höchste Korrelation mit der Krankheit auf (1). Antikörper gegen Sm zeigen ein Muster mit granulärer ANA Färbung, während Antikörper gegen dsDNA generell ein Muster mit homogener ANA Färbung zeigen. Obwohl niedrige anti-dsDNA Antikörperwerte in Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom, Progressiver Systemischer Sklerodermie, Dermatomyositis, Diskoidem Lupus Erythematodes und MCTD (2), vorhanden sein können, werden hohe dsDNA Antikörperwerte fast ausschließlich in SLE gefunden. Es wird angenommen das Antikörper gegen dsDNA in der Pathogenese der schwerwiegendsten Formen von SLE beteiligt sind wenn sie sich als Immunkomplexe (3) ablagern. Antikörper gegen dsDNA kommen in hohen Titern vor und weil sie mit der Krankheitsaktivität (4) korrelieren, ist ihr Nachweis wichtig in der Behandlung von SLE Patienten.

Verschiedene Testmethoden stehen für den Nachweis von anti-dsDNA Antikörpern zur Verfügung. Die am häufigsten eingesetzten Methoden umfassen die indirekte Immunfluoreszenz, den Radioimmunoassay, die Counterimmunoelektrophorese und die Immunodiffusion (5-8). Das Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA Testsystem ist ein Enzym-Immuntestsystem (EIA) der Antikörper in Seren gegen dsDNA nachweist.

FUNKTIONSWEISE DES TESTS

Dieser Test ist ein indirekter Enzym-Immuntest. Die Oberfläche der Mikrotiterplatten wurde mit stabilisierten dsDNA Antigenen beschichtet die im System als Antigensubstrat dient. Verdünnte Patientenproben werden in die Kavitäten gegeben und inkubiert, so das in der Probe vorhandene spezifische Antikörper mit dem gebundenen Antigen in der Festphase reagieren können. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumproteine werden abgewaschen und anschließend werden die Kavitäten mit antihumanen Antikörpern (Ziege) inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind. Das im Testsystem enthaltene Meerrettich-Peroxidase Antikörperkonjugat Präparat ist spezifisch für humane IgG Gammaketten.

Nach der Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-Konjugat wird in positiven Proben ein dreiteiliger Komplex gebildet. Dieser besteht aus einem Meerrettich-Peroxidase konjugierten antihumanen Antikörper, gebunden an humane dsDNA-Antikörper, die wiederum an das auf der Plastikoberfläche stabilisierte Antigen gebunden sind.

Nach einem weiteren Waschvorgang wird dieser Komplex durch Addition einer Lösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂ als chromogenes Substrat nachgewiesen. Der Grad der Farbentwicklung in den Kavitäten ist proportional zur Konzentration von dsDNA-Antikörpern in den Serumproben. Jede Kavität wird in einem Spektralphotometer mit 450 nm analysiert.

SYSTEMKOMPONENTEN - IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Aufbewahrung: Sämtliche Komponenten sollten bei 2-10°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Nicht einfrieren.



Haltbarkeit: Alle Komponenten sind bis mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum haltbar. Keine Komponenten nach Überschreiten des Verfallsdatums verwenden.



REAKTIVE REAGENZIEN

Mit dsDNA beschichtete Mikrotiterplattenstreifen **PLATE:** Katalognummer 7008-17. Ein Mikrotiterplattenrahmen mit zwölf Streifen je acht Kavitäten, beschichtet mit dsDNA. Wenn weniger als acht Kavitäten für den Ansatz benötigt werden, können einzelne Kavitäten abgetrennt werden. Unbenutzte Streifen können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Probenverdünner **SOLN|DIL:** Katalognummer 7100 (100 ml).
Spezieller gepufferter Probenverdünner zur Verdünnung der Patientenproben.

Enzym-Antikörper-Reagens - spezifisch für die humane IgG Gammakette **CONJ|HRP:** Katalognummer 7009-17 (14 ml). Anti-Human-IgG (spezifisch für Gammaketten), an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens.

Substratlösung **SOLN|SUB**   : Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-spezifische Enzymsubstratlösung, enthält stabilisiertes 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Gebrauchsfertiges Reagens. **GEFAHR:** Entzündlich. Dieses Reagenz enthält weniger als 25% Methanol und Azeton. Es darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. Bei Kontakt mit den Augen sofort gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.

Stopplösung **SOLN|STOP**   : Katalognummer 7033 (14 ml). Spezielle Stopplösung für EIA-Testsysteme von Immuno Concepts. Gebrauchsfertiges Reagens. **GEFAHR:** Korrosiv. Dieses Reagens enthält Salz- und Schwefelsäure (jeweils weniger als 3 % Volumenanteil) und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Für Kinder unzugänglich aufbewahren. Bei Kontakt mit Augen, sofort und gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Dieses Reagens niemals mit Wasser verdünnen.

anti-dsDNA Positivkontrolle **CONTROL|+:** Katalognummer 7021-17 (2 ml). Humanes Positivkontrollserum das Antikörper gegen dsDNA enthält. Dieses Serum ist vorverdünnt und gebrauchsfertig. Siehe Flaschenetikett für die zu erwartenden Werte in Internationalen Einheiten/ml (IU/ml).

Negativkontrolle **CONTROL|-:** Katalognummer 7031 (2 ml). Humanes Negativkontrollserum das keine Antikörper gegen dsDNA enthält. Dieses Serum ist vorverdünnt und gebrauchsfertig.

anti-dsDNA Kalibratorserum 1 bis 4 **CAL:** Katalognummern 7261-17, 7262-17, 7263-17, 7264-17, (je 1,5 ml). Humanes Kalibratorserum das Antikörper gegen dsDNA enthält. Dieses Kalibratorserum ist vorverdünnt und gebrauchsfertig. Kalibrator 3 kann als Einpunktkalibrator benutzt werden. Diese Kalibratorseren wurden mit dem WHO Referenzpräparat Wo80 getestet, um die Antikörperkonzentration in Internationalen Einheiten/ml (IU/ml) zu ermitteln. Siehe Flaschenetikett für die anti-dsDNA Konzentration in Internationalen Einheiten/ml (IU/ml).

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

Streifenhalter

Waschpufferlösung

PBS-Waschpuffer **PWDR|PBS:** Bestellnummer 1011. Phosphat-gepuffertes Salzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für 1 Liter gebrauchsfertigen Puffer. (Zwei Beutel je 96 Kavitäten Mikrotiterplatte sind im Lieferumfang des Testkits enthalten.)

Waschpuffer Konzentrat **SOLN|WASH:** Katalognummer 1031 (10 ml). 5% Tween 20. Lösung zur Benutzung mit dem Waschpuffer. (Zwei Glasfläschchen Waschpuffer Konzentrat je 96 Kavitäten Mikrotiterplatte sind im Lieferumfang des Testkits enthalten.)

Herstellung: Einen Beutel PBS Pulver in 1 Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Den kompletten Inhalt einer Flasche Waschpuffer Konzentrat zum gelösten PBS hinzufügen. Gut mischen und gekühlt bei 2-25°C bis zu 4 Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind. Die Waschpufferlösung muss vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden.

Gebrauch: Alle Komponenten werden fertig für den Gebrauch geliefert, kein Aliquotieren oder Rekonstituieren nötig, (außer dem PBS Puffer welcher vor dem Gebrauch in entionisiertem oder destilliertem Wasser gelöst werden muss).

Haltbarkeit: Alle Komponenten sind vom Herstellungsdatum an bis zu 12 Monate haltbar. Bitte benutzen Sie keine der Komponenten nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Präzisionspipetten für Volumina von 25-1000 µl
Spritzflasche für die Zugabe von Waschpufferlösung in die Kavitäten der Mikrotiterplatte, oder ein automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
1 Liter-Behälter für die PBS-Waschpufferlösung
Deionisiertes oder destilliertes Wasser
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten für Absorptionsmessungen bei 450 nm
Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen
Saugpapier oder Papierhandtücher
Mehrkanal-Pipette für bis zu 8 Kavitäten
Einmalhandschuhe
Laborstoppuhr

SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche für dieses Produkt verwendeten Materialien humanen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) getestet. Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder ein anderes infektiöses Agens vorhanden ist. Daher sollten alle Kitbestandteile wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen siehe: Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Natriumazid (0,09%) wird als Konservierungsmittel genutzt. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und explosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien ist daher mit reichlich Leitungswasser nachzuspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Das Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.
7. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
8. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
9. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls können die Ergebnisse verfälscht werden.
10. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Während der Tests müssen die Proben in den Kavitäten der Mikrotiterplatten verbleiben.
11. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
12. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Mikrotiterstreifen und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
13. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
14. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
15. Das Stoppreagens ist korrosiv und kann Verbrennungen verursachen. Dieses Reagens enthält Salz- und Schwefelsäure (jeweils weniger als 3 % Volumenanteil) und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Für Kinder unzugänglich aufbewahren. Bei Kontakt mit Augen, sofort und gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Dieses Reagens niemals mit Wasser verdünnen.

PROBENGEWINNUNG

Probennahme: Nach Möglichkeit sollten Serumproben verwendet werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem aseptisch ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Zimmertemperatur (18-25°C) gerinnen lassen. Danach muss das Serum so bald wie möglich durch Zentrifugation abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische, ikterische oder durch Mikroben verunreinigte Seren dürfen nicht verwendet werden, weil diese zu falschen Ergebnissen führen können. Proben mit sichtbaren Verunreinigungen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

Aufbewahrung: Die Serumproben können bei einer Temperatur von 2-10°C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20°C eingefroren werden. Serum darf nicht in einem Gefrier- oder Kühlschranks mit Abtauautomatik gelagert werden.

ACHTUNG: *Wiederholtes Einfrieren/Auftauen von Patientenproben ist zu vermeiden. Andernfalls können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten.*

ALLGEMEINE HINWEISE ZUM VERFAHREN

1. Vor der Verwendung müssen alle Serumproben und Kitbestandteile unbedingt auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden. Ein Liter Waschpuffer benötigt mehrere Stunden, um nach Entnahme aus dem Kühlschrank 20°C zu erreichen. Inkubationstemperaturen außerhalb des hier angegebenen Bereichs können die Ergebnisse verfälschen. Unverbrauchte Proben und Kitmaterialien müssen nach Verwendung wieder gekühlt werden.
2. Die Reagenzien vor dem Test durch vorsichtiges Umdrehen der Flasche gut durchmischen. Auf keinen Fall schütteln oder auf einen Mischer stellen. Schaumbildung vermeiden.
3. Beim Herstellen der Probenverdünnungen sollten die Pipettenspitzen vor der Zugabe des Serums in den Probenverdünner abgewischt werden. Außen an der Pipette anhaftendes überschüssiges Probenmaterial kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Das Arbeiten mit einer Mehrkanalpipette wird empfohlen, es stellt eine gleichmäßige Proben- und Reagenseinbringung sicher womit auch die Inkubations- und Reaktionszeiten gleichmäßiger ausfallen.
5. **Sorgfältiges Waschen der Kavitäten ist von entscheidender Bedeutung.** Unzureichendes Waschen der Kavitäten führt zu hohen Hintergrundwerten und unter Umständen zu falsch-positiven Ergebnissen. Beim Waschen von Hand zunächst den Inhalt der Kavitäten absaugen, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Entfernen Sie den gesamten Waschpuffer durch Umdrehen der Platte und einer anschließenden kurzen Schüttelbewegung des Handgelenks. Wiederholen Sie diesen Schritt für alle 3 bis 5 Waschgänge. Anschließend die Platten auf einem Papierhandtuch oder einem anderem saugendem Material ausklopfen, um die letzten Spuren des Waschpuffers vollständig zu entfernen. Die Verwendung eines automatischen Waschgeräts für Mikrotiterplatten wird empfohlen, weil dieses gleichmäßigere Waschergebnisse sichert.
HINWEIS: Auf Grund der verschiedenen Waschtechniken und Automatiksysteme muss die Anzahl der Waschgänge evtl. angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Jedes Labor muss für sein Waschsystem die Anzahl der Waschgänge für die maximale Effizienz selbst bestimmen.
6. Unzureichende Entfernung von Waschpufferrückständen kann zu inkonsistenter Farbentwicklung führen. Die Streifen sollten wie zuvor beschrieben auf einem Papierhandtuch oder einem anderem saugendem Material kräftig ausgeschlagen und umgedreht ausgelegt werden, um Waschpufferrückstände zu minimieren.
7. Die bei den Inkubationsschritten angegebene Zeitdauer muss unbedingt eingehalten werden. Alle Serumproben müssen vor Versuchsbeginn verdünnt werden und dann in kürzester Zeit (maximal fünf Minuten) in die Kavitäten pipettiert werden. Die Testserien sollten nur so groß sein, dass diese Zeit bequem eingehalten werden kann. Der Gebrauch eines Pipettierautomaten erleichtert den Umgang mit Proben und Reagenzien und wird empfohlen.
8. Mit Ausnahme des letzten Inkubationsschritts (Substratlösung) beginnt jede Inkubation nach fertiggestellter Proben- oder Reagenzienzugabe. Die Inkubation der Substratlösung muss für jede Kavität genau 30 Minuten dauern. Daher sollten alle Proben und Reagenzien in derselben Reihenfolge und im selben zeitlichen Takt zugegeben werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

BERECHNUNGEN

1. Die Absorptionswerte der Reagenzienleerkavität werden von den Absorptionswerten der Standard-, bzw. der Kontrollseren und Patientenproben abgezogen. Bei Doppelbestimmungen den Mittelwert beider Absorptionswerte errechnen.

2. Tragen Sie den Mittelwert der Absorption jedes Kalibratorserums 1 bis 4 in das RELISA[®] Kalibrator Arbeitsblatt ein, indem sie den um den Reagenzienleerwert berichtigten O.D. Wert für die y-Achse und den gekennzeichneten IU/ml Wert für die x-Achse verwenden. Zeichnen Sie eine Ausgleichsgerade zwischen den Kalibratorwerten.
3. Ermitteln Sie den IU/ml Wert jeder Patientenprobe durch Interpolieren aus der Standardkurve.
4. Wenn sie eine Software benutzen, wählen sie einen 4-Parameter Fit mit lin-log Koordinaten für die O.D. und die Konzentration und eine „best-fit“ Kurve.

OPTIONALE EINPUNKT-KALIBRATIONSMETHODE

1. die Absorptionswerte der Reagenzienleerkavität werden von den Absorptionswerten des Kalibrators, bzw. der Kontrollseren und Patientenproben abgezogen. Bei Doppelbestimmungen den Mittelwert beider Absorptionswerte errechnen.
2. Um den Umrechnungsfaktor zu erhalten, teilen sie die spezifische IU/ml-Konzentration der Antikörper des Kalibrators #3 (siehe Etikett) durch den Mittelwert des Absorptionswertes der Kalibratorkavitäten.
3. Um die spezifische Antikörper Konzentration in IU/ml zu erhalten, nehmen Sie die Absorptionswerte der einzelnen Proben mit dem Umrechnungsfaktor mal.
4. Eine vereinfachte Form dieser Kalkulation ist nachfolgend dargestellt:

$$\frac{\text{Kalibrator \#3 Wert (IU/ml)} \times \text{Absorption der Proben}^*}{\text{Absorption des Kalibrators \#3}} = \text{IU/ml-Wert der Probe}$$

*Bei Doppelbestimmungen den Mittelwert beider Absorptionswerte errechnen.

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Der mittlere Absorptionswert des Kalibrators #3 muss bei mindestens 0,40 OD liegen. Absorptionswerte unter 0,40 OD weisen auf eine unzureichende Farbentwicklung und einen ungültigen Ansatz hin. Eine unzureichende Farbentwicklung entsteht üblicherweise durch den Gebrauch von kalten Reagenzien oder durch inkorrektes Timing von einem oder mehreren Schritten des Tests. Bringen sie die Reagenzien auf Zimmertemperatur (18-25°C) und wiederholen sie den Testansatz und achten sie dabei vor allem auf das Timing aller Schritte.
2. Die Leerwertkavität muss einen Absorptionswert von unter 0,150 haben. Höhere Absorptionswerte als 0,150 weisen auf unzureichendes Waschen oder eine Kontamination der Reagenzien und einen unzureichenden Testlauf hin.
3. Die anti-dsDNA Werte welche durch die positive Kontrolle erzielt werden, sollten innerhalb der Größenordnung liegen die auf den Etiketten angegeben ist. Diese Größenordnung wurde eingeführt, um 95% der voraussichtlichen Werte auf Grund der statistisch normalen Abweichungen einzugrenzen. Gelegentliche kleinere Abweichungen außerhalb dieser Größenordnungen sind zu erwarten. Jedes Labor sollte seine eigenen akzeptiert/abgelehnt Kriterien basierend auf der Erfahrung mit diesem Testverfahren aufstellen.
4. Proben die spezifische Antikörperwerte aufweisen welche höher sind als der höchste Grenzwert des Kalibrator #3 sollten „höher als“ der Einzelwert des Kalibrator #3 angegeben werden.
5. Die Standardkurve muss für jeden Testansatz erstellt werden (bzw. wenn sie die optionale Einpunkt Kalibration verwenden müssen sie den Umrechnungsfaktor für jeden Testansatz berechnen). Der Gebrauch einer Standardkurve oder eines Umrechnungsfaktor aus einem anderen Testansatz führt zu invaliden Ergebnissen.
6. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenz Normalwerte, basierend auf der Population der Patienten und anderen lokalen Faktoren, erstellen und pflegen.
7. Die Positivkontrolle ist ein humanes Serum das Antikörper gegen dsDNA enthält. Dies ist eine qualitative Kontrolle die einen Wert größer als 35 IU/ml ergeben sollte.
8. Die Negativkontrolle ist ein humanes Serum das keine Antikörper gegen dsDNA enthält. Diese Kontrolle sollte einen Wert kleiner als 35 IU/ml ergeben.

INTERPRETATION DER PATIENTENPROBEN

Es konnte ein Ansteigen und Fallen der dsDNA-Antikörperwerte während des Krankheitsverlaufs nachgewiesen werden, die klinische Signifikanz eines einzelnen Antikörperwertes wird jedoch immer noch untersucht (13). Die in diesem Test erzielten Einzelwerte sind lediglich dafür gedacht die Patienten in die folgenden großen Gruppen einzuteilen.

Patientenproben deren errechnete Werte höher als oder gleich 35 IU/ml sind, sind als positiv anzusehen.

Patientenproben deren errechnete Werte niedriger als 35 IU/ml sind, sind als negativ anzusehen.

Jedes Labor sollte seine eigenen Referenznormalwerte, basierend auf der Population der Patienten die getestet werden, erstellen. Die Einzelwerte werden durch Patientenfaktoren, mechanische Faktoren (wie zum Beispiel die Präzision des Pipettierens und Genauigkeit) sowie dem Zustand der Kits (wie zum Beispiel Temperatur und das Timing der Schritte) beeinflusst. Fortlaufende Bestimmungen an einem Patienten können das Ansteigen und Fallen der Antikörperwerte aufzeigen.

BERICHT DER ERGEBNISSE

Das Testergebnis ist als positiv oder negativ für Antikörper gegen dsDNA, mit dem IU/ml-Wert anzugeben. Die Antikörperwerte die in einer einzelnen Probe gefunden werden haben eine begrenzte klinische Signifikanz. Fortlaufende Bestimmungen an einem Patienten können das Ansteigen und Fallen der Antikörperwerte aufzeigen, welche dem Krankheitsverlauf (13) folgen.

BESCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis von anti-dsDNA Antikörper Befunden eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
2. Es sollte keine Behandlung initiiert werden aufgrund eines positiven Testergebnisses für dsDNA-Antikörper. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Einige Pharmazeutika, dazu gehören Procainamide und Hydralazine, können eine Lupus erythematodes ähnliche Krankheit hervorrufen. Patienten mit einem durch Pharmazeutika hervorgerufenem LE können positive ANAs, üblicherweise gegen nukleäres Histon zeigen, jedoch wurden auch Antikörper gegen dsDNA berichtet (9-10, 14).
4. Obwohl ein hoher anti-dsDNA Wert den Eindruck von SLE erwecken kann, sollte er nicht als Diagnose, sondern eher als ein Teil der Krankheitsgeschichte des Patienten, aufgefasst werden. Niedrige dsDNA Antikörperwerte sind oft in Patientenseren mit Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom, Progressiver Systemischer Sklerodermie, Dermatomyositis, Diskoidem Lupus erythematodes und verschiedenen Bindegewebserkrankungen (2) vorhanden.
5. Patienten mit einer Steroidtherapie können negative Ergebnisse gegen dsDNA Antikörper (11) aufweisen.
6. Die Ergebnisse dieses Tests sollten zusammen mit den vorhanden Informationen der Anamnese und anderen diagnostischen Verfahren verwendet werden, um den klinischen Status des Patienten zu ermitteln.

ERWARTETE WERTE

Die zu erwarteten Werte in der normalen Population sind negativ (niedriger als 35 IU/ml). Patientenproben mit systemischem Lupus können bis zu 70 % anti-dsDNA Antikörper (15) aufweisen. Bestimmte Pharmazeutika können die Produktion von dsDNA-Antikörpern induzieren(14).

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

Das RELISA® anti-dsDNA Testsystem wurde mit einem anderen IgG anti-dsDNA Antikörper Elisa Testsystem verglichen, das kommerziell vertrieben wird. Die getestete Population bestand aus 108 Proben die positiv für dsDNA getestet wurden und 100 normalen Proben von Blutspendern, die parallel mit dem Vergleichstest und dem zu vergleichendem Testsystem getestet wurden. Auf Grund dieses Vergleiches, wurden die folgenden Daten unter Verwendung der Mehrpunktkalibration erzielt:

| | | IgG anti-dsDNA Vergleichs Testsystem | |
|---------------------------------------|---------|---|---------|
| | | Positiv | Negativ |
| Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA | Positiv | 105 | 6 |
| | Negativ | 3 | 94 |

Diese Daten ergeben die folgenden statistischen Werte: positive Übereinstimmung 97,2%; negative Übereinstimmung 94,0%; und eine insgesamt Übereinstimmung von 95,70%.

Basierend auf diesem Vergleich, wurden die folgenden Daten durch die optionale Einpunktkalibrationsmethode erzielt:

| | | IgG anti-dsDNA Vergleichs Testsystem | |
|---------------------------------------|---------|---|---------|
| | | Positiv | Negativ |
| Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA | Positiv | 103 | 5 |
| | Negativ | 5 | 95 |

Diese Daten ergeben die folgenden statistischen Werte: positive Übereinstimmung 95,4%; negative Übereinstimmung 95,0%; und eine insgesamt Übereinstimmung von 95,2%.

Normaler Bereich: Der normale Bereich für diesen Testlauf wurde durch den Test von Serumproben von 261 gesunden Blutspendern festgelegt. Nur zwei von diesen Proben wiesen Anti-dsDNA Antikörperwerte höher als 35 IU/ml auf.

KLINISCHE SPEZIFITÄT

Mit dem Immuno Concepts RELISA® dsDNA Antikörper Testsystem wurden Serumproben von 117 Patienten getestet, die wegen rheumatischer Beschwerden den Arzt aufgesucht hatten. Diese Patientenpopulation wurde auf Grund ihrer klinischen rheumatischen Erkrankungen ausgewählt, nicht jedoch auf Grund eines spezifischen Krankheitsstadiums. In dieser Population waren 4 Proben (3,4%) positiv für anti-dsDNA Antikörper.

KLINISCHE SENSITIVITÄT

Serumproben von 39 Patienten mit SLE wurden mit dem Immuno Concepts RELISA® dsDNA Antikörper Testsystem getestet. Acht (20,5%) dieser Proben waren positiv für anti-dsDNA Antikörper.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Präzision des Kits wurde mittels dreier Proben gemessen, die anti-dsDNA-Werte innerhalb des linearen Teils der Standardkurve aufwiesen. Diese Proben wurden zwanzigmal auf drei verschiedenen Lotnummern der mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatten aufgetragen und von einem technischen Assistenten in einem Testlauf durchgeführt. Die Intra-Assay und Inter-Assay Präzision wird in den folgenden Tabellen gezeigt:

INTRA-ASSAY PRÄZISION

| n = 20 | Mittelwert (IU/ml) | S.D. | %C.V. |
|---------------|---------------------------|-------------|--------------|
| Probe 1 | 610 | 14 | 2 |
| Probe 2 | 315 | 14 | 5 |
| Probe 3 | 114 | 10 | 9 |

INTER-ASSAY PRÄZISION

| n = 60 | Mittelwert (IU/ml) | S.D. | %C.V. |
|---------------|---------------------------|-------------|--------------|
| Probe 1 | 601 | 24 | 4 |
| Probe 2 | 329 | 16 | 5 |
| Probe 3 | 122 | 11 | 9 |

VALIDIERUNG DER EINPUNKT-KALIBRATION

Die Einpunkt-Kalibration wurde mit den gleichen 108 Seren validiert, die zum Vergleich mit einem Referenztestsystem benutzt wurden. Regressionsanalysen dieses Vergleiches ergaben einen Regressionskoeffizienten (r^2) von 97,95%. Aus praktischer Sicht gesehen, sahen wir in diesem Vergleich nur drei Proben (2,7%) die Unstimmigkeiten in der Diagnose zwischen dem vierpunktkalibrationssystem und dem optionalen Einpunktkalibrationssystem zeigten. Alle Proben hatten anti-dsDNA IU/ml Werte nahe des 35 IU/ml Grenzwertes, im Bereich von 33 bis 40 IU/ml. Diese Art von Probe ist in jedem Testsystem ein Problem bei der Diagnose und muss von den Laborspezialisten welche die Probe analysieren und die Daten auswerten, sorgfältig geprüft werden.

KREUZREAKTIVITÄTS STUDIEN

Insgesamt 11 positive Seren die Autoantikörper gegen einschließlich Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70 und Jo-1 enthielten; wurden mit dem Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA Test System getestet. Keine dieser Proben ergab ein positives Ergebnis im Immuno Concepts RELISA® dsDNA-Test System.

BIBLIOGRAPHIE

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.

Im Falle der Beschädigung der Umverpackung kontaktieren Sie vor Gebrauch bitte Immuno Concepts



Hersteller



Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft



Temperatur-Beschränkung



Enthält genügendes für <n> Tests



Beachten Sie die Anwendungsvorschriften



In vitro Medizinische Diagnoseeinheit



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-De

Rev 2.2

© Copyright 2016

RELISA® ANTI-DsDNA TESTVERFAHREN

Vor der Testdurchführung müssen alle Proben, Reagenzien (auch der Waschpuffer) und Mikrotiterstreifen auf Zimmertemperatur gebracht werden.

- 1. ARBEITSBLATT AUSFÜLLEN**

In das mit dem Kit gelieferte Arbeitsblatt die Position der Proben in den Mikrotiterplatten eintragen. Die Kalibratoren sollten doppelt getestet werden. Um die Mehrpunktstandardkurve nutzen zu können, müssen alle vier Kalibratorseren getestet werden. Um die optionale Einpunktkalibrationsmethode nutzen zu können, muss nur das Kalibrator #3 Serum doppelt getestet werden. Eine Kavität dient als Leerwert. Es wird empfohlen, jede Patientenprobe, jeden Kalibrator und jedes Kontrollserum solange doppelt zu testen, bis eine vom Labor akzeptierte Bestimmungsgenauigkeit etabliert wurde.
- 2. WASCHPUFFER (PBS-TWEEN) REKONSTITUIEREN**

Inhalt eines Beutels mit PBS-Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Fügen sie dem 1 Liter Behälter mit gelöstem PBS den gesamten Inhalt einer Flasche des Waschpufferkonzentrats hinzu und mischen sie diese gut durch. Die PBS-Waschpufferlösung kann verschlossen und gekühlt (2-25°C) bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.
- 3. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN**

Patientenproben durch Zugabe von 25 µl Patientenserum zu 975 µl Probenverdünner 1:40 verdünnen und gut durchmischen. Der Kalibrator und die Kontrollseren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.
- 4. MIKROTITERSTREIFEN VORBEREITEN**

Die benötigte Anzahl Streifen aus den Beuteln entnehmen und in den Halter einsetzen. Die Streifen müssen fest im Rahmen sitzen. Drücken Sie an beiden Enden des Streifens bis dieser sicher im Rahmen einrastet. Falls nur einzelne Kavitäten oder kein voller Streifen verwendet werden ist zu überprüfen ob jede Kavität fest sitzt. Streifen die korrekt im Halter sitzen können beim Umdrehen des Halters dann nicht herausfallen. Wenn weniger als acht Kavitäten für den Ansatz benötigt werden können diese durch abknicken getrennt werden. Unbenutzte Streifen oder Kavitäten können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- 5. SERUMVERDÜNNUNGEN AUFTRAGEN**

Je 100 µl Kalibrator, Kontrollseren und Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, wie im Arbeitsblatt eingetragen. 100 µl Probenverdünner in die für den Leerwert vorgesehene Kavität pipettieren.
- 6. STREIFEN INKUBIEREN (30 Minuten bei Zimmertemperatur, d. h. 18-25°C)**

Die Streifen 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein. Es wird empfohlen, die Streifen mit Klebeband oder einem Papierhandtuch abzudecken, um sie vor Staub und anderen Fremdkörpern zu schützen.
- 7. STREIFEN WASCHEN (siehe auch Allgemeine Hinweise zum Verfahren, Punkte 5 und 6)**

Kavitäten drei bis fünf Mal mit PBS-Waschpufferlösung auswaschen Beim Waschen von Hand zunächst den Inhalt der Kavitäten absaugen, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Entfernen sie den gesamten Waschpuffer durch Umdrehen der Platte und einer anschließenden kurzen Schüttelbewegung des Handgelenks. Wiederholen sie diesen Schritt für alle 3 bis 5 Waschgänge. Anschliessend die Platten auf einem Papierhandtuch oder einem anderem saugendem Material ausklopfen, um die letzten Spuren des Waschpuffers vollständig zu entfernen.
- 8. ENZYM-ANTIKÖRPER-REAGENS ZUGEBEN**

100 µl Anti-IgA Enzym-Antikörper-Reagens in jede Kavität pipettieren.
- 9. STREIFEN INKUBIEREN (30 MINUTEN BEI Zimmertemperatur, d. h. 18-25°C)**

Die Streifen 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren lassen. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein. Es wird empfohlen, die Streifen mit Klebeband oder einem Papierhandtuch abzudecken, um sie vor Staub und anderen Fremdkörpern zu schützen.
- 10. KAVITÄTEN WASCHEN**

Kavitäten drei bis fünfmal mit PBS-Waschpufferlösung auswaschen Beim Waschen von Hand zunächst den Inhalt der Kavitäten absaugen, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Entfernen sie den gesamten Waschpuffer durch Umdrehen der Platte und einer anschließenden kurzen Schüttelbewegung des Handgelenks. Wiederholen sie diesen Schritt für alle 3 bis 5 Waschgänge. Anschliessend die Platten auf einem Papierhandtuch oder einem anderem saugendem Material ausklopfen, um die letzten Spuren des Waschpuffers vollständig zu entfernen.
- 11. SUBSTRATLÖSUNG ZUGEBEN**

Eine Laborstoppuhr verwenden, um sicherzustellen, dass die Zeiten genau eingehalten werden. 100 µl Substratlösung in jede Kavität pipettieren. Die Substratlösung muss in gleichmäßigen Zeitabständen zugegeben werden, um sicherzustellen, dass jede Kavität exakt 30 Minuten inkubiert. In Kavitäten mit positiven Proben verfärbt sich die Lösung blau. In den anderen Kavitäten bleibt die Lösung farblos oder wird nur schwach blau.
- 12. STREIFEN INKUBIEREN (genau 30 Minuten bei Zimmertemperatur, d. h. 18-25°C)**

Die Streifen genau 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein.
- 13. STOPPREAGENS ZUGEBEN**

Nach genau 30 Minuten Inkubation der ersten Kavität, in jede Kavität 100 µl Stopplösung zugeben und zwar in derselben Reihenfolge und im selben Rhythmus wie bei der Zugabe der Substratlösung. Nach Zugabe der Stopplösung färbt sich blaue Substratlösung gelb, während eine farblose Lösung farblos bleibt.
- 14. ABSORPTION MESSEN**

Die Absorption der Kavitäten muss innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stoppreagens mit einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer gemessen werden. Die Kavitäten werden bei 450 nm um den Leerwert korrigiert gemessen. Wenn ein Multispektrometer zur Verfügung steht sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden. Wenn die Messung bei 450 nm ohne Referenzwellenlänge erfolgt, sind die ermittelten Absorptionswerte höher.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG: +1-916-363-2649
oder via E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com