

SISTEMA DE TESTE RELISA® anti-dsDNA

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

Números de Catálogo: 7096-17 (96 poços) e 7696-17 (576 poços)

USO PRETENDIDO: *Este é um sistema de imunoensaio enzimático (EIA) para detecção de anticorpos anti-dsDNA em soro humano. Este sistema de teste destina-se ao uso como auxiliar no diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico.*

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) podem produzir anticorpos para uma variedade de antígenos nucleares, mas os anticorpos direcionados contra Sm (antígeno Smith) e DNA de cadeia dupla (dsDNA) mostram a maior correlação com a doença (1). Os anticorpos direcionados contra Sm demonstram padrão de coloração pontilhado de ANA, ao passo que os anticorpos direcionados contra dsDNA, em geral, apresentam padrão de coloração homogênea de ANA. Embora os baixos níveis de anticorpos anti-dsDNA possam ser presença frequente no soro de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva, dermatomiosite, lúpus eritematoso discoide e doença mista do tecido conjuntivo (2), os altos níveis de anticorpos anti-dsDNA são vistos quase exclusivamente no LES. Acredita-se que os anticorpos contra dsDNA estão envolvidos na patogênese das variantes mais graves de LES, quando se depositam como complexos imunes (3). Os anticorpos anti-dsDNA ocorrem em altos títulos e, como se correlacionam com a atividade da doença (4), sua detecção é importante no tratamento dos pacientes com LES.

Existem diversos ensaios para a detecção de anticorpos anti-dsDNA. Os métodos mais usados incluem imunofluorescência indireta, radioimunoensaio, contra-imunoeletroforese e imunodifusão (5-8). O Sistema de teste RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts é um método de imunoensaio enzimático (EIA) que detecta anticorpos séricos para dsDNA.

PRINCÍPIO DO TESTE

Esse teste é um EIA indireto. Os antígenos dsDNA humanos estabilizados foram usados para revestir a superfície dos micropoços, visando servir como substrato antigênico nesse sistema. As amostras diluídas do paciente são colocadas nos micropoços e incubadas, permitindo que os anticorpos específicos da amostra reajam com o antígeno na fase sólida. Depois de lavagem para remover os anticorpos não-ligados e outras proteínas do soro, os poços são incubados com anticorpos anti-humanos de cabra marcados com *horseradish* peroxidase. A preparação de anticorpo conjugado a *horseradish* peroxidase que é incluída no sistema de teste é específica para IgG de cadeias gama.

Depois da incubação com o conjugado HRP, forma-se um complexo estável de três partes se os resultados forem positivos. Este complexo consiste no anticorpo anti-humano conjugado com HRP ligado aos anticorpos anti-dsDNA, que são ligados ao antígeno estabilizado na superfície de plástico.

Após outra etapa de lavagem, esse complexo é detectado adicionando-se uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) e H_2O_2 como substrato cromogênico. O grau de desenvolvimento de cor em cada poço é proporcional à concentração de anticorpos anti-dsDNA em cada amostra de soro. Cada micropoço é lido em um espectrofotômetro em 450 nm.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. Não congelar.



Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilize qualquer componente depois de sua data de validade.



REAGENTES REATIVOS

Tiras de micropoços revestidas com dsDNA [PLATE]: Número de Catálogo 7008-17. Um suporte de micropoços com 12 tiras de 8 poços revestidos com dsDNA. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. As tiras não utilizadas podem ser recolocadas na bolsa de papel alumínio com a bolsa de agente dessecante, vedada com o fecho tipo zíper e refrigeradas por até 45 dias.

Diluyente da amostra [SOLN|DIL]: Número de Catálogo 7100 (100 ml). Diluyente tamponado de amostra patenteado para diluir amostras de pacientes.

Reagente de anticorpo enzimático - IgG humana de cadeia gama específica [CONJ|HRP]: Número de Catálogo 7009-17 (14 ml). IgG anti-humana (cadeia gama específica) conjugada a *horseradish* peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para usar.

Solução de substrato [SOLN|SUB]   : Número de Catálogo 7035 (14 ml). Solução de substrato enzimático específico para HRP, contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O reagente vem pronto para usar. **PERIGO:** Inflamável. Este reagente contém menos de 25% de metanol e acetona. Mantenha fora do alcance de crianças. Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico.

Reagente de parada [SOLN|STOP]   : Número de Catálogo 7033 (14 ml). Reagente de parada patenteado para sistemas de testes EIA da Immuno Concepts. O reagente vem pronto para usar. **PERIGO:** Corrosivo. Este reagente contém ácidos clorídrico e sulfúrico (menos de 3% cada, por volume), e deve ser manuseado com cuidado. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contato com os olhos, enxágue imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

Controle positivo para anti-dsDNA-ES [CONTROL|+]: Número do Catálogo 7021-17 (2 ml). Soro humano de controle positivo que contém anticorpos anti-dsDNA. Este soro está na diluição de trabalho e pronto para usar. Ver a faixa esperada de Unidades Internacionais/ml (UI/ml) na etiqueta do frasco.

Controle negativo [CONTROL|-]: Número de Catálogo 7031 (2 ml). Soro humano de controle negativo que não contém anticorpos anti-dsDNA. Este soro está na diluição de trabalho e pronto para usar.

Soros calibradores anti-dsDNA de 1 a 4 [CAL]: Números de Catálogo: 7261-17, 7262-17, 7263-17, 7264-17, (1.5 ml cada). Soros calibradores humanos que contém anticorpos anti-dsDNA. Esses soros calibradores estão na diluição de trabalho e prontos para o uso. O calibrador 3 pode ser usado como calibrador de ponto simples. Estes soros calibradores foram testados com a preparação que Wo80 referência para determinar a concentração de anticorpos em unidades internacionais / ml (UI / ml). Veja rótulos dos frascos para as concentrações de anticorpos dsDNA, anti em UI / ml.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Suporte para os micropoços

Solução tampão de lavagem:

Tampão PBS [PWDR|PBS]: Número de Catálogo: 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. (Para cada placa de 96 micropoços são fornecidas duas bolsas de tampão em pó no kit completo do teste).

Concentrado de solução tampão de lavagem [SOLN|WASH]: Número de Catálogo: 1031 (10 ml). Solução Tween 20 a 5% para ser usada como tampão de lavagem. (Para cada placa de 96 micropoços são fornecidos dois frascos de tampão concentrado no kit completo do teste).

Preparação: Dissolver uma bolsa de tampão em pó em um litro de água desionizada ou destilada. Adicionar todo o conteúdo de um frasco de Concentrado de solução tampão de lavagem ao PBS dissolvido. Misturar bem e armazenar entre 2 °C e 25 °C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis. A solução tampão de lavagem deve estar em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes do uso.

Uso: Todos os componentes vêm prontos para uso, sem necessidade de compor alíquotas ou de reconstituição (exceto para o tampão PBS que deve ser dissolvido em água desionizada ou destilada antes do uso).

Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilize qualquer componente depois de sua data de validade.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetadores de precisão volumétrica para dispensar volumes de 25-1000 µl
Almotolia para dispensar solução tampão de lavagem nos micropoços ou sistema de lavagem automática dos micropoços
Recipiente de um litro para solução tampão PBS de lavagem
Água desionizada e destilada
Espectrofotômetro de leitura de placa capaz de ler absorbância em 450 nm
Tubos de ensaio para preparar diluições de soro
Papel absorvente ou papel-toalha
Pipetadores multicanais capazes de dispensar em 8 poços
Luvas descartáveis
Temporizador de laboratório

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados neste produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os materiais do kit devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas no nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
4. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
5. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
6. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida e quantidade abundante de água.
7. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
8. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
9. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados errôneos.
10. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos. As amostras devem ficar confinadas aos micropoços durante o teste.
11. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.
12. Deixar todos os reagentes, micropoços e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar.
13. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
14. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
15. O reagente de parada é corrosivo e pode causar queimaduras. Este reagente contém ácidos clorídrico e sulfúrico (menos de 3% cada, por volume), e deve ser manuseado com cuidado. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contato com os olhos, enxágue imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostras preferida. Cerca de 5 ml de sangue total devem ser coletados de modo asséptico, por punção venosa com tubo de coleta estéril e a vácuo ou com outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para minimizar a hemólise.

Substâncias interferentes: O soro que apresenta alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser usado, porque essas condições podem ocasionar resultados falsos. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

Armazenamento: O soro pode ser armazenado a 2 °C a 10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado congelado a -20 °C ou menos. O soro não deve ser armazenado em refrigerador ou freezer com autodescongelamento.

CUIDADO: O congelamento e descongelamento repetitivo das amostras dos pacientes pode gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

NOTAS GERAIS SOBRE O PROCEDIMENTO

1. É extremamente importante deixar todos os componentes do kit e as amostras de soro em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar. Um litro inteiro de tampão de lavagem pode demorar várias horas para se aquecer até 20 °C depois de ser removido do refrigerador. As temperaturas de incubação acima ou abaixo da faixa determinada podem causar resultados imprecisos. Recolocar as amostras e reagentes não usados no armazenamento refrigerado.
2. Misturar bem os reagentes antes de usar, invertendo os frascos suavemente. Não usar vórtex nem agitar os reagentes. Evitar produção de espuma.
3. Ao preparar diluições de amostra, as pontas da pipeta devem ser limpas primeiro, para dispensar o soro no diluente da amostra. O excesso de amostra que adere ao lado externo da ponta da pipeta afeta os resultados.
4. O uso de pipetador multicanais é recomendado porque proporciona dispensação do reagente, tempos de incubação e tempos de reação mais uniformes.
5. **A lavagem apropriada dos poços é de extrema importância.** Os poços inadequadamente lavados apresentam altos valores de fundo e pode mostrar valores falso-positivos. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir o as etapas de enchimento e drenagem até um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual. O uso de sistema automático de lavagem de micropoços garante a lavagem uniforme dos poços e é recomendado.
NOTA: Devido aos vários tipos de técnicas de lavagem e de sistemas automáticos, o número de lavagens deve ser ajustado de modo a se obter os resultados ideais. Cada laboratório deve determinar o número mais eficiente de lavagens para seu sistema.
6. A remoção imprópria de tampão de lavagem residual pode causar desenvolvimento irregular das cores. As tiras de micropoços devem batidas e secas em papel absorvente ou toalhas para minimizar os resíduos de tampão de lavagem.
7. O tempo de todas as etapas é essencial. Todas as amostras de soro devem ser diluídas antes do início do procedimento, e devem ser dispensadas nos micropoços no menor período de tempo possível (não mais de cinco minutos). O tamanho dos lotes deve ser definido de modo que a manipulação das amostras possa ser realizada confortavelmente dentro desse período. O uso de pipetador multicanais facilita o manuseio das amostras e dos reagentes, e é recomendado.
8. Com exceção da última incubação (solução de substrato), o início de cada período de incubação ocorre no término da dispensação da amostra ou do reagente. A incubação da solução de substrato deve ser exatamente 30 minutos para cada poço. Todas as amostras e reagentes devem ser dispensados na mesma sequência e em velocidade constante.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

CÁLCULOS

1. Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco do reagente dos valores de absorbância obtidos nos poços do soro padrão, de controle e da amostra do paciente. Calcular os valores de absorbância média para poços duplicados.
2. Fazer o gráfico do valor de absorbância média de cada soro calibrador de 1 a 4 na planilha de curva do calibrador do RELISA®, usando a densidade óptica (DO) da solução de branco ajustada no eixo das coordenadas (y) e o valor de UI/ml no eixo das abscissas (x). Desenhar a melhor linha de ajuste de progressão entre os pontos do calibrador.
3. Obter o valor de UI/ml para cada amostra de paciente, pela interpolação da Curva do calibrador.
4. Ao usar um *software*, empregar função de 4 parâmetros com coordenadas lin-log para densidade óptica e concentração, e a curva de melhor ajuste.

MÉTODO DE CALIBRAÇÃO DE PONTO ÚNICO OPCIONAL

1. Subtrair o valor de absorvância para o poço de reagente de branco dos valores de absorvância obtidos nos poços do soro calibrador, controle e da amostra do paciente. Calcular os valores de absorvância média para poços duplicados.
2. Dividir a concentração de anticorpo específico em UI/ml do Soro calibrador no. 3 (declarada na etiqueta) pelo valor de absorvância média dos poços de calibrador para obter o fator de conversão.
3. Os valores de absorvância de cada uma das amostras são multiplicados pelo fator de conversão para se obter a concentração do anticorpo específico em UI/ml.
4. A forma simplificada desses cálculos pode ser expressa como:

$$\frac{\text{Valor do Calibrador no. 3 (UI/ml)}}{\text{Absorvância do Calibrador no. 3}} \times \text{Absorvância da amostra}^* = \text{Valor em UI/ml para amostra}$$

*Se os calibradores e as amostras forem executados em duplicata, usar a absorvância média dos poços com teste em duplicata.

CONTROLE DE QUALIDADE

1. O valor de absorvância média dos poços de Calibrador no. 3 deve ser pelo menos 0,400. Os valores de absorvância inferior a 0,400 indicam desenvolvimento inadequado da cor e, portanto, uma execução inválida. O desenvolvimento de cor inadequada em geral se deve ao uso de reagentes resfriados ou de tempo incorreto em uma ou mais etapas do ensaio. Deixar os reagentes aquecerem até a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C), e repetir a execução prestando atenção especial para o tempo de todas as etapas.
2. O poço de controle de solução de branco deve ter absorvância inferior a 0,150. Os valores de absorvância da solução de branco superiores a 0,150 indicam lavagem inadequada ou contaminação dos reagentes, e uma execução inválida.
3. Os valores de anticorpo anti-dsDNA obtidos para o controle positivo devem estar dentro da faixa indicada na etiqueta do frasco. Essa faixa foi estabelecida de modo a abranger 95% dos valores esperados, devido à variação normal em termos estatísticos. Pequenos desvios ocasionais fora dessas faixas são esperados. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios de aceitação ou rejeição com base em sua experiência com este ensaio.
4. As amostras com valores de anticorpos específicos superiores ao limite superior do Calibrador no. 3 devem ser relatadas como maiores que o valor unitário do Calibrador no. 3.
5. A Curva de calibrador deve ser desenhada para cada execução (ou o fator de conversão deve ser calculado quando se usa a calibração de ponto de calibração simples opcional). Usar a Curva de calibrador ou o Fator de conversão de outra execução invalida os resultados.
6. Cada laboratório deve estabelecer e manter seus próprios valores de referência (normal), com base na população de pacientes e em outros fatores locais.
7. O soro de controle positivo é soro humano que contém anticorpos anti-dsDNA. Esse é um controle qualitativo, que deve produzir um resultado superior a 35 UI/ml.
8. O soro de controle negativo é uma mistura de soro humano que não contém anticorpos anti-dsDNA. Esse controle deve produzir um resultado inferior a 35 UI/ml.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

Demonstrou-se que os níveis de anticorpos anti-dsDNA elevam-se e caem conforme o curso da doença, mas a significância de um nível de anticorpo único ainda está sendo estudada (13). Os valores unitários obtidos neste ensaio destinam-se simplesmente a separar os pacientes nos seguintes três grandes grupos. Os poços de amostra do paciente que têm valores calculados inferiores ou iguais a 35 UI/ml são considerados positivos. Os poços de amostra do paciente que têm valores calculados inferiores a 35 UI/ml são considerados negativos. Cada laboratório deve estabelecer sua própria faixa de referência e valores de corte, com base na população de pacientes testados. Os valores unitários são afetados por fatores do paciente, considerações mecânicas (como precisão e correção da pipetagem), e condições do ensaio (como temperatura e tempo transcorridos nas etapas.) As determinações em série dos níveis de anticorpo em um paciente podem indicar a elevação ou a queda desses níveis.

LAUDO DE RESULTADOS

Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos para anticorpos anti-dsDNA, com o valor em UI/ml. Os níveis de anticorpos encontrados em uma única amostra limitaram a significância clínica. As determinações em série dos níveis de anticorpo em um paciente podem indicar elevação ou queda desses níveis, que comprovadamente acompanham o curso da doença (13).

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpos anti-dsDNA. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos e do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos anti-dsDNA. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.

3. Certas medicações, inclusive procainamida e hidralazina, podem induzir doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico. Os pacientes com LE induzido por medicação podem ser positivos para ANAs comumente direcionados contra as histonas nucleares, embora o anticorpo anti-dsDNA também tenha sido relatado (9-10, 14).
4. Ainda que o alto nível de anti-dsDNA possa ser bastante sugestivo de LES, não se pode considerá-lo diagnóstico, mas sim, deve ser visto como parte da história clínica geral de um paciente. Os baixos níveis de anticorpos anti-dsDNA em geral estão presentes no soro de pacientes com artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica progressiva, dermatomiosite, lúpus eritematoso sistêmico e doença mista do tecido conectivo (2).
5. Os pacientes que recebem tratamento com esteroides podem ter resultados negativos para anticorpo anti-dsDNA (11).
6. Os resultados desse teste devem ser usados em conjunto com as informações obtidas na avaliação clínica e em outros procedimentos diagnósticos, para determinar o estado clínico do paciente.

VALORES ESPERADOS

O valor esperado na população normal é negativo (menos de 35 UI/ml). Nos pacientes com lúpus sistêmico, até 70% podem apresentar anticorpos anti-dsDNA (15). Certas medicações podem induzir a produção de anticorpo anti-dsDNA (14).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema de teste RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts foi comparado com outro sistema de teste EIA para IgG anti-dsDNA que é distribuído no comércio. A população estudada constou de 108 amostras que foram positivas para dsDNA e 100 amostras de sangue de doadores normais que foram testadas em paralelo com o dispositivo predicado eo dispositivo assunto. Com base nessa comparação, os seguintes dados foram obtidos através do ponto de calibração multi-método:

		Teste anti-dsDNA do dispositivo legalmente comercializado	
		Positivo	Negativo
RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts	Positivo	105	6
	Negativo	3	94

Esses dados geraram a seguinte estatística: acordo positivo, 97,2%; acordo negativo, 94,0% e um acordo global, 95,7%.

Com base nessa comparação, os seguintes dados foram obtidos, usando-se o método de um só ponto opcional:

		Teste anti-dsDNA do dispositivo legalmente comercializado	
		Positivo	Negativo
RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts	Positivo	103	5
	Negativo	5	95

Esses dados geraram a seguinte estatística: acordo positivo, 95,4%; acordo negativo, 95,0% e um acordo global, 95,2%.

Normal Range: O intervalo normal para este ensaio foi determinada através de testes de amostras de soro de 261 doadores de sangue saudáveis. Apenas duas dessas amostras apresentaram valores superiores a 35 UI / ml de anticorpos anti-dsDNA.

ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O sistema de teste RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts foi usado para testar amostras de 117 pacientes atendidos em consultas reumatológicas. Essa população de pacientes foi selecionada devido às doenças reumáticas clínicas, mas não devido a qualquer estado patológico específico. Nessa população, quatro amostras (3,4%) foram positivas para anticorpos anti-dsDNA.

SENSIBILIDADE CLÍNICA

As amostras de soro de 39 pacientes com LES foram testadas no Sistema de teste RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts. Oito (20,5%) dessas amostras foram positivas para anticorpos anti-dsDNA.

REPRODUTIBILIDADE

A precisão do ensaio foi medida usando-se três amostras que tinham valores anti-dsDNA na porção linear da curva de calibração.

Essas amostras foram executadas 20 vezes em três lotes de número diferente de tiras de micropoços revestidos com antígeno em um evento de teste e por um tecnólogo. A precisão intraensaio e entre ensaios é demonstrada nas seguintes tabelas:

PRECISÃO INTRAENSAIO

n = 20	Média (UI/ml)	DP	%C.V.
Amostra 1	610	14	2
Amostra 2	315	14	5
Amostra 3	114	10	9

PRECISÃO ENTRE ENSAIOS

n = 60	Média (UI/ml)	DP	%C.V.
Amostra 1	601	24	4
Amostra 2	329	16	5
Amostra 3	122	11	9

VALIDAÇÃO DE CALIBRAÇÃO DE UM SÓ PONTO

O uso de um calibrador de um só ponto foi validado com o mesmo grupo de 108 soros que foi usado para a comparação com o dispositivo legalmente comercializado. A análise de regressão dessa comparação mostrou coeficiente de regressão (r^2) de 97,95%. Do ponto de vista prático, nessa comparação, são encontradas apenas três amostras (2,7%) que mostraram discrepâncias diagnósticas entre o sistema de calibração de quatro pontos e o sistema de calibração de um só ponto opcional. Todas essas amostras tinham valores em UI/ml de anti-dsDNA próximos do ponto de corte de 35 UI/ml, variando de 33 a 40 UI/ml. Esse tipo de amostra constitui problema diagnóstico em qualquer sistema de ensaio, e precisa ser considerado cuidadosamente pelos profissionais de laboratório que analisam as amostras e interpretam os dados.

ESTUDOS DE REATIVIDADE CRUZADA

Um total de 11 soros que continham autoanticorpos, inclusive Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70 e Jo-1 foram testados com o Sistema de teste RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts. Nenhuma dessas amostras produziu resultado positivo no Sistema de teste RELISA® anti-dsDNA da Immuno Concepts.

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.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827

Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649

Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCEDIMENTO DO TESTE RELISA® ANTI-DSDNA

Todas as amostras, reagentes (inclusive a solução tampão de lavagem) e os micropoços devem estar em temperatura ambiente antes do uso.

- 1. PREPARAÇÃO DA PLANILHA**

Etiquetar a planilha incluída no kit para indicar a localização das amostras nos micropoços. Testar os padrões em duplicata. Para usar a curva multipontos, os cinco soros padrões devem ser executados. Para o método de calibração de ponto simples opcional, executar apenas o Padrão no. 3 em duplicata. Um poço é usado para um branco de reagente. Recomendamos que cada amostra de controle e de paciente seja testada em duplicata até que uma precisão aceitável para o ensaio seja estabelecida em seu laboratório.
- 2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE LAVAGEM (PBS-Tween)**

Dissolver o conteúdo de uma bolsa de tampão PBS em um litro de água desionizada ou destilada. Adicionar todo o conteúdo de um frasco de Concentrado de tampão de lavagem a um recipiente de um litro de PBS dissolvido. Misturar bem. A solução tampão de lavagem pode ser tampada e armazenada a 2 °C a 25 °C por até quatro semanas.
- 3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE**

Diluir as amostras do paciente até 1:40 adicionando 25 µl de soro a 975 µl do diluente da amostra. Misturar bem. O soro calibrador, o controle positivo e o controle negativo são fornecidos na diluição de trabalho e não requerem mais diluição.
- 4. PREPARAÇÃO DOS MICROPOÇOS**

Remover o número necessário de tiras de micropoços da bolsa e colocá-las no suporte. Os micropoços devem ficar firmemente assentados nesse suporte. Pressionar firmemente os dois lados das tiras, de modo que elas encaixem com segurança no suporte. Ao usar poços individuais ou menos que uma tira completa de poços, certificar-se que cada poço esteja firmemente assentado. Os poços adequadamente assentados não caem quando o suporte é invertido. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. Os poços não usados podem ser recolocados na bolsa de papel alumínio, vedada com o fecho tipo zíper e refrigerados por até 45 dias.
- 5. DISPENSAÇÃO DE DILUIÇÕES DE SORO**

Dispensar 100 µl dos calibradores, controles e amostras diluídas do paciente nos poços apropriados como indicado na planilha. Dispensar 100 µl de diluente da amostra no poço de branco do reagente.
- 6. INCUBAÇÃO DE LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**

Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. As tiras devem ser protegidas de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, as tiras podem ser cobertas com fita transparente ou com papel-toalha para protegê-las de poeira e outros corpos estranhos.
- 7. LAVAGEM DAS TIRAS (Ver Notas de Procedimentos Gerais 5 e 6)**

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS-Tween de lavagem. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir as etapas de enchimento e drenagem até um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual.
- 8. DISPENSAÇÃO DO REAGENTE DE ANTICORPO ENZIMÁTICO**

Dispensar 100 µl de reagente de anticorpo enzimático em cada um dos poços.
- 9. INCUBAÇÃO DE LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**

Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. As tiras devem ser protegidas de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, as tiras podem ser cobertas com fita transparente ou com papel-toalha para protegê-las de poeira e outros corpos estranhos.
- 10. LAVAGEM DAS TIRAS**

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS-Tween de lavagem. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir as etapas de enchimento e drenagem até um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual.
- 11. DISPENSAÇÃO DE SOLUÇÃO DE SUBSTRATO**

Usando um temporizador para garantir intervalos iguais, dispensar 100 µl de solução de substrato a cada um dos poços. A solução de substrato deve ser adicionada aos poços em velocidade constante, de modo que cada um deles seja incubado exatamente pela mesma extensão de tempo (30 minutos). A solução de substrato nos poços incubados com amostras positivas fica azul e a solução nos poços incubados com amostras negativas será incolor a azul muito claro.
- 12. INCUBAÇÃO DE LÂMINAS (Exatamente 30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**

Incubar em temperatura ambiente por exatamente 30 minutos. Os tiras devem ser protegidos de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação.
- 13. DISPENSAÇÃO DO REAGENTE DE PARADA**

Depois que o primeiro poço for incubado por exatamente 30 minutos, adicionar 100 µl de reagente de parada a cada poço, na mesma ordem e na mesma velocidade que a solução de substrato foi adicionada aos poços. À adição do reagente de parada, a solução de substrato azul fica amarela e a solução incolor permanece incolor.
- 14. LEITURA DA ABSORBÂNCIA DOS POÇOS**

Dentro de 30 minutos depois da adição do reagente de parada, os poços podem ser lidos em um espectrofotômetro de leitura de placa. Os poços são lidos em 450 nm contra o poço de branco de controle. Ao se usar espectrofotômetro de comprimento de onda duplo, o comprimento de onda para o filtro de referência deve definido em 600-650 nm. A leitura dos micropoços em 450 nm sem filtro de referência resultará em valores de absorbância maiores.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649

Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

