



REF 4015

6 de mayo, 2009

Anti-dsDNA

- 96 determinaciones -



IVD Dispositivo de diagnóstico *In vitro*

Enzimoimmunoensayo para la determinación de anticuerpos IgG contra dsDNA en suero o plasma humano

REF	Número de catálogo	LOT	Código de Lote
	Documentos acompañantes de consulta		Fabricado por
	Limitación de temperatura		Fecha de vencimiento
	Manual de operaciones		Riesgo biológico



GA GENERIC ASSAYS GmbH

Ludwig-Erhard-Ring 3

15827 Dahlewitz, Germany

Telephone: +49 (0) 33708 – 9286 - 0
Fax: +49 (0) 33708 – 9286 - 50

www.genericassays.com

INDICACION DE USO

Anti-dsDNA se usa en la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG contra el ácido desoxiribonucleico de doble cadena (dsDNA) en suero o plasma humano para el diagnóstico diferencial de Lupus eritematoso sistémico (SLE).

Las enfermedades autoinmunes sistémicas, entre las cuales se cuenta el lupus eritematoso sistémico, se caracterizan por la producción de una variedad de autoanticuerpos dirigidos contra componentes celulares del núcleo o del plasma.

Aunque la relevancia patológica de los anticuerpos antifosfolipídicos no ha sido aún completamente dilucidada, la determinación de algunas de sus especificidades juega un papel importante en el diagnóstico diferencial y el seguimiento de enfermedades autoinmunes sistémicas.

La etiología del lupus eritematoso sistémico es aún desconocida. La enfermedad está caracterizada por una patología multi-sistémica y con predominancia en las mujeres (9:1). Los primeros síntomas clínicos se suelen presentar durante el desarrollo de la fertilidad en la mujer.

La determinación de anticuerpos contra dsDNA es la prueba "Gold estándar" en el diagnóstico de SLE y está incluida en los criterios de diagnóstico del Colegio Americano de Reumatología (1,2)

Generic Assays ofrece una completa gama de marcadores serológicos para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes sistémicas. Todas las pruebas emplean un esquema similar de ensayo, donde la pre-dilución maximiza la eficiencia del ensayo.

- (1) Tan EM: Antibodies to nuclear antigens (ANA) and their immunobiology and medicine. Adv Immunol 1982 33:167-240
- (2) Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982 25:1271-7

PRINCIPIO DEL TEST

Anti-ds-DNA es un enzimoimmunoensayo para la determinación cuantitativa de anticuerpos contra el ácido desoxiribonucleico de doble cadena (dsDNA) en suero o plasma humano.

Los anticuerpos de los calibradores, del control, y de las muestras diluidas reaccionan con dsDNA inmovilizado en la fase sólida de la microplaca. La utilización dsDNA altamente purificado garantiza la unión específica de anticuerpos igG presentes en las muestras bajo estudio. Tras un periodo de incubación de 60 minutos a temperatura ambiente (TA), los componentes del suero no fijado son extraídos mediante un paso de lavado.

Los anticuerpos IgG fijados reaccionan específicamente en un paso siguiente de incubación de 30 min. a TA con IgG anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El conjugado en exceso es separado de los inmuno-complejos fijados mediante lavado.

La HRP convierte la solución incolora de 3'3'5'5' tetrametilbencidina (TMB) en un producto de color azul. Luego de 15 min. de incubación a temperatura ambiente, la reacción se interrumpe añadiendo una solución ácida (H₂SO₄). La solución vira entonces de color azul a amarillo.

La densidad óptica (DO) de la solución a 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos específicamente. La curva estándar se establece relacionando los valores de las concentraciones de anticuerpo de los calibradores (eje X), con sus valores respectivos de DO (eje Y). La concentración de los anticuerpos en las muestras bajo estudio se lee directamente de la curva estándar. También es posible evaluar por un método semicuantitativo utilizando el calibrador 2 como calibrador de corte (cut-off).

MUESTRAS DE PACIENTES

Extracción y conservación de las muestras

La sangre se extrae por punción venosa. Tras el periodo de coagulación se separa el suero por centrifugación. No deben utilizarse muestras hemolisadas o contaminadas, ni con un elevado contenido en lípidos. Se puede utilizar también plasma. Las muestras pueden conservarse entre 2° y 8°C hasta por 3 días. Para periodos prolongados se deben conservar a -20°C.

Deben evitarse ciclos repetidos de congelación/descongelación. Si las muestras se van a utilizar en varios ensayos, se recomienda que se hagan alícuotas desde el principio y se conserven a -20°C

Preparación antes del uso

Las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de comenzar el ensayo. Se debe tener la precaución de agitar cuidadosamente las muestras de suero para asegurar su homogeneidad.

Nota: Las muestras de los pacientes deben diluirse 1 + 100 (v/v) antes de comenzar con el ensayo, ej. 10 µl de la muestra + 1 ml del diluyente de la muestra (C).

COMPONENTES DEL TEST PARA 96 DETERMINACIONES

A Ag 96	Placa de microtitulación , 12 tiras quebrables por 8 pocillos (total 96 pocillos) recubiertos con dsDNA purificado	1 Sellado al vacío con desecante
B BUF WASH 10 x	Buffer de lavado concentrado Suficiente para 1000 ml de solución	100 ml Concentrado tapa blanca
C DIL	Diluyente de muestra	100 ml listo para uso tapa negra
D CONJ	Conjugado conteniendo IgG anti-humano (oveja) acoplado con HPR	15 ml listo para uso tapa roja
E SOLN TMB	Sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en buffer citrato conteniendo peróxido de hidrógeno	15 ml listo para uso tapa azul
F H ₂ SO ₄ 0.25M	Solución Stop 0.25 M ácido sulfúrico	15 ml listo para uso tapa amarilla
0 - 4 CAL	Calibradores (suero diluido) conc.: 1, 10, 30, 100, 300 U/ml	1 ml cada uno listo para uso
P CONTROL	Control positivo (suero diluido) conc.: ver folleto adjunto	1 ml listo para uso

Materiales requeridos

- micropipeta 100 - 1000 µl
- micropipeta 10 - 100 µl
- pipeta multi-canal 50 - 200 µl
- cubeta para pipeta multi-canal
- Peine de lavado de 8 canales con una bomba de vacío y una botella de descarte o una lavadora de microplaca
- Lector de microplaca con filtros ópticos para 450 nm y 620 nm o 690 nm.
- Agua destilada o desionizada

Presentación y conservación

Anti-dsDNA se ha diseñado para 96 determinaciones. La fecha de caducidad de cada uno de los componentes se indica en su etiqueta respectiva, y la del kit completo en la etiqueta externa del empaque. A su recepción todos los componentes del kit deben conservarse entre 2-8° C, preferiblemente en su envase original.

Después de abierto, todos los componentes del kit son estables por lo menos durante 2 meses, bajo condiciones apropiadas de almacenamiento

Preparación antes del uso

Todos los componentes deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su utilización en el ensayo. La micro-placa viene sellada al vacío en una bolsa de aluminio con desecante.

La placa está formada por el soporte y las tiras de pocillos divisibles. El empaque con la placa debe alcanzar la temperatura ambiente antes de ser abierto. Los pocillos que no se vayan a utilizar deben guardarse refrigerados y protegidos de la humedad en su bolsa original debidamente cerrada.

Se debe preparar una cantidad suficiente de solución de lavado diluyendo la solución de lavado concentrada 10 veces (1+ 9 v/v) con agua desionizada o destilada. Por ejemplo, diluir 8 ml del concentrado con 72 ml de agua destilada. La solución de lavado así preparada es estable a 2-8°C hasta por 30 días.

Puede ocurrir cristalización del buffer concentrado de lavado; los cristales se disuelven calentando la solución a 37 °C. Debe asegurarse que el tiempo de lavado con el tampón en los pocillos sea de al menos 5 segundos en cada uno de los ciclos.

¡Evitar la exposición a la luz de la solución de sustrato TMB!!

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- Diluir el suero del paciente con diluyente de la muestra (C) 1 + 100 (v/v), e.j. 10 µl suero + 1.0 ml diluyente de la muestra (C).
- Evitar la variación de tiempo durante el pipeteo de los reactivos y las muestras.

1. Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18-25°C) antes del uso. Mezclar suavemente sin causar espuma.
2. Dispensar en los pocillos respectivos
100 µl calibradores 1 – 4 (0 opcional) o
100 µl calibrador 2 (semicuantitativo)
100 µl control positivo (P)
100 µl muestra diluida del paciente.
3. Incubar **60 min** a temperatura ambiente (18-25°C).
4. Decantar, luego lavar cada pocillo **tres** veces utilizando **300 µl** de solución de lavado (elaborada a partir de B).
5. Agregar **100 µl** de solución de conjugado (D) a cada pocillo.
6. Incubar **30 min** a temperatura ambiente (18-25°C).
7. Decantar, luego lavar cada pocillo **tres** veces utilizando **300 µl** de solución de lavado (elaborada a partir de B).
8. Agregar **100 µl** de sustrato (E) a cada pocillo.
9. Incubar **15 min protegiendo de la luz** a temperatura ambiente (18-25°C).
10. Agregar **100 µl** de solución stop (F) a cada pocillo y mezclar suavemente.
11. Leer la DO a **450 nm** versus 620 o 690 nm dentro de **30 min** luego de agregada la solución stop.

PROCESAMIENTO DE DATOS

Anti-dsDNA permite una evaluación de resultados cuantitativa y semicuantitativa (Calibrador 1 para determinación de punto de corte).

Evaluación Cuantitativa

La curva estándar se establece graficando los valores medios de DO de los calibradores 1-4 (CAL 0 opcional) en las ordenadas, eje-y, (escala lineal) versus sus concentraciones respectivas de anti-dsDNA en las abscisas, eje-x (escala logarítmica). Las concentraciones de anti-dsDNA de las muestras son leídas directamente en U/ml contra los valores respectivos de DO.

Si se utiliza la dilución recomendada para las muestras de suero de 1 + 100 (v/v) y si el resto de los reactivos se suministran de acuerdo a estos volúmenes, entonces no se requiere un factor de corrección.

Evaluación semicuantitativa

Los resultados son interpretados calculando el índice de unión (BI) usando para ello el calibrador 2 (30 U/ml) como calibrador de punto de corte (cut-off). El índice BI es el cociente entre el valor DO de la muestra y el valor de punto de corte del calibrador 1.

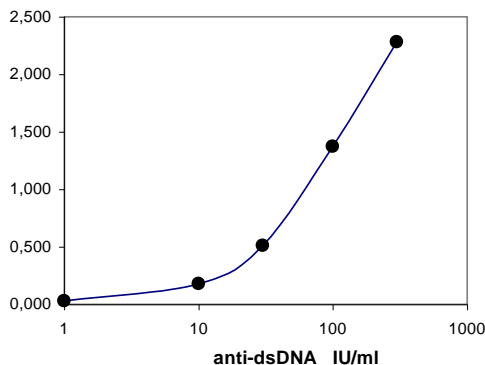
$$BI = DO_{\text{muestra}} / DO_{\text{calibrador 2}}$$

La determinación de las concentraciones de los anticuerpos Anti-dsDNA para ambos casos, puede ser llevada a cabo con la asistencia de un software integrado al equipo de fotometría.

Ejemplo de resultados de un ensayo típico

Pocillo	DO (a)	DO (b)	DO (media)	IU/ml
Calibrador 0	0,028	0,029	0,029	1
Calibrador 1	0,175	0,184	0,180	10
Calibrador 2	0,504	0,518	0,511	30
Calibrador 3	1,350	1,394	1,372	100
Calibrador 4	2,271	2,289	2,280	300
Paciente 1	1,179	1,159	1,169	75

CURVA ESTANDAR TIPICA



Las muestra con una DO > calibrador 4, deberán ser diluidas con volúmenes mayores de diluyente de muestra y analizadas nuevamente. Los resultados son multiplicados por el factor de dilución elegido.

Validez del test

El test realizado es válido si:

- La DO promedio del calibrador 1 es ≤ 0.5
- La OD promedio del calibrador 4 es ≥ 1.2

Si los criterios de calidad mencionados arriba no son alcanzados, repetir el test y asegurarse de que el procedimiento del test es seguido correctamente (tiempos de incubación y temperaturas, dilución de la muestra y del buffer de lavado, etapas de lavado, etc.) En caso de fallas repetidas del criterio de calidad contacte con su proveedor.

VALORES DE REFERENCIA

Anti-dsDNA	U/ml	BI
positivo	> 35	≥ 1.0
negativo	< 30	< 1.0
Rango ambiguo	30 - 35	1.0 - 1.2

Muestras ubicadas en el rango ambiguo deberán ser analizadas nuevamente.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus rangos de referencia normales y patológicos para niveles de Anti-dsDNA en suero, como usualmente se realiza para otros parámetros de diagnóstico. En consecuencia, los valores de referencia aquí dados deben considerarse únicamente como una guía en cuanto a los valores que pueden esperarse del ensayo.

Limitaciones del Método

Muestras de individuos sanos, deberán resultar negativas para Anti-dsDNA; sin embargo individuos aparentemente sanos pueden mostrar un resultado positivo a la presencia de anticuerpos Anti-dsDNA. Ningún diagnóstico clínico debe basarse únicamente en los resultados de un método para diagnóstico in vitro. El personal médico deberá considerar todos los resultados clínicos y de laboratorio para establecer un diagnóstico.

DATOS CARACTERISTICOS DEL ENSAYO

Calibración

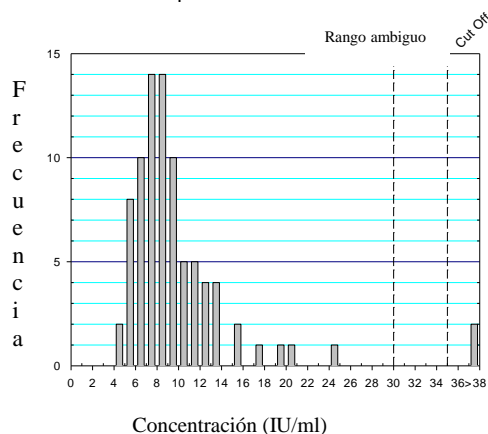
Anti-dsDNA esta calibrado con el suero de referencia internacional WO/80 (Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam).

Sensibilidad

44 sueros de pacientes clínicamente diagnosticados con SLE mostraron una sensibilidad > 95% con Anti-dsDNA en comparación con otro kit comercial de ELISA para el mismo parámetro.

Especificidad

84 sueros de donantes no seleccionados fueron analizados con Anti-dsDNA, mostrando una especificidad del 98%:



Presición

Intra-ensayo (n=8)		Inter-ensayo (n=4x8)	
IU/ml	CV (%)	IU/ml	CV (%)
180	3.3	157	7.6
92	3.9	130	8.4
67	4.5	92	5.0
41	2.4	41	8.6

Anti-dsDNA (4015)

Diluciones de muestras de pacientes 10 µl suero + 1.0 ml diluyente de la muestra (C)

1	Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18 - 25°C) antes de su utilización.			
		Calibrador	Control	Suero
2	Pipetear	Calibradores (0 – 4) o calibrador 2 Control (P) Suero de paciente prediluido 1 +100	100 µl	100 µl
3	Incubar	60 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)		
4	Lavar	Decantar, 3 x 300 µl (hecho de B)		
5	Pipetear conjugado (D)	100 µl	100 µl	100 µl
6	Incubar	30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)		
7	Lavar	Decantar, 3 x 300 µl (hecho de B)		
8	Pipetear sustrato (E)	100 µl	100 µl	100 µl
9	Incubar protegido de la luz	15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)		
10	Pipetear solución stop (F)	100 µl	100 µl	100 µl
11	Medir a 450 nm versus 620 (690) nm			

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- **Este kit es para uso in vitro únicamente.** Se deben seguir las instrucciones cuidadosamente. GA GENERIC ASSAYS GmbH y sus distribuidores autorizados no serán responsables por daños ocasionados indirectamente o a consecuencia de cambios o modificaciones del procedimiento indicado. El kit debería ser llevado a cabo solamente por personal técnico entrenado.
- Las fechas de vencimiento indicadas en los respectivos rótulos deben ser respetadas. Del mismo modo, la estabilidad que se indique para los reactivos reconstituidos debe ser tenida también en cuenta.
- No usar o mezclar reactivos de lotes diferentes.
- No usar reactivos de otros fabricantes
- Evitar variaciones de tiempo durante el pipeteo de estándares, muestras y reactivos.
- Mientras no sean usados, todos los reactivos deben ser mantenidos a 2 -8 °C en el envase original.
- Algunos de los reactivos contienen pequeñas cantidades de Timerosal (< 0.1 % p/v) y Kathon (1.0 % v/v) como conservantes. Se debe evitar salpicaduras y contacto con piel y mucosas.
- Los materiales derivados de fluidos u órganos humanos usados en la elaboración de este kit han sido evaluados, y los resultados encontrados han sido negativos para HBsAg y HIV, así como también para anticuerpos contra HCV. No obstante, ninguna prueba conocida garantiza la ausencia de tales agentes virales. Por lo tanto, es necesario manipular los componentes del kit, así como las muestras de los pacientes como potencialmente infecciosos.
- Debido a que este kit puede contener materiales potencialmente peligrosos, deben tomarse las siguientes precauciones:
 - No fumar, comer o beber mientras se maneja el material
 - Usar guantes protectores,
 - Nunca pipetear con la boca,
 - Secar las salpicaduras rápidamente, lavando la zona afectada con un desinfectante.