

Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cualitativa de la Presencia de Anticuerpos IgG contra el DNA de Doble Cadena (dsDNA) en Suero ó Plasma Humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de dsDNA

USO DESTINADO

Para la determinación cualitativa de la presencia de anticuerpos IgG contra dsDNA en suero ó plasma humano.

INTRODUCCIÓN

Anti-DNA de doble cadena (dsDNA) está presente en 50% a 70% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE). Circulantes complejos de DNA / anti-DNA inmunes se considera que desempeñan un papel en la patogénesis de SLE. La presencia de anticuerpos anti-DNA de doble cadena es uno de los criterios diagnósticos de SLE. Los anticuerpos IgG a DNA de doble cadena se consideran clínicamente útil para el diagnóstico y tratamiento del Lupus Eritematoso Sistémico. Los anticuerpos contra el DNA monocatenario (DNAmc) y anticuerpos IgM de DNA se encuentran en un número de otras enfermedades del hígado, así como en algunos individuos normales. ELISA es el método de elección para la detección de anticuerpos anti-DNA de doble cadena en los pacientes con sospecha de SLE.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El suero diluido del paciente se añade a los pocillos revestidos con antígeno purificado dsDNA. Si esta presente el anticuerpo específico IgG contra ANA, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y la enzima de conjugado se añade para enlazarse con el complejo anticuerpo-antígeno, si está presente. El exceso de conjugado de enzima es lavado y el sustrato se añade. La placa se incuba para permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Placa de microtira revestida con antígeno dsDNA con 96 pozos
2. Diluyente de la Muestra. 1 Frasco
3. Enzima Conjugada. 1 Frasco. Listo para su uso
4. Sustrato TMB. 1 Frasco. Listo para su uso
5. Calibrador. 1 Vial. Listo para su uso
6. Control Positivo. 1 Vial. Listo para su uso
7. Control Negativo. 1 Vial. Listo para su uso
8. Solución de Paro. 1 Frasco. Listo para su uso
9. Buffer Concentrado de Lavado 20x. 1 Frasco

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión

2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Papel absorbente o toalla de papel
5. Papel cuadriculado
6. Un lector de MicroElisa.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8 °C.
2. Mantenga micropocillos sellados en una bolsa seca con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta el vencimiento del kit.
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, el sol o luz intensa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. Materiales con posible Riesgo Biológico: El Calibrador U Los controles contienen componentes de origen humano que han sido probados y no se han encontrado reactivos al antígeno de superficie de Hepatitis B, así como anticuerpos contra el HIV por métodos aprobados por la FDA. Sin embargo, ningún método puede garantizar por completo la ausencia de estos agentes, deben ser manejados en el nivel 2 de bioseguridad, como se recomienda en Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories." 1984
2. Este kit está diseñado para uso exclusivo en investigación.
3. Los resultados óptimos se obtienen por el estricto cumplimiento del protocolo de la prueba, pipeteo preciso, tiempos exactos y requisitos de temperatura.
4. No pipetee los reactivos con la boca. No fumar, comer O beber en las áreas en las que las muestras o reactivos se manejen.
5. Los componentes de este kit están destinados para su uso como una unidad integral. Los componentes del lote no deben ser mezclados.
6. Este producto contiene compuestos conservados con azida de sodio. La azida de sodio puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre para formar azidas metálicas explosivas. Su eliminación es con abundante agua.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

1. Recoger las muestras de sangre y separar el suero.
2. Las muestras se pueden refrigerar entre 2-8 °C durante un máximo de siete días o congelar hasta por seis meses. Evite congelar y descongelar.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Preparar buffer de lavado 1x mediante la adición del contenido de la botella (25 mL, 20x) a 475 mL de agua destilada o agua desionizada. Guarde a temperatura ambiente (18-26 °C)

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Coloque todas las muestras y los reactivos del kit a temperatura ambiente (18-26 °C) y mezclar suavemente.

1. Coloque el número deseado de tiras en el soporte.
2. El control negativo, control positivo y calibrador están listos para usar. Prepare una dilución de 1:21 de la muestras de ensayo, me-



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

dante la adición de 10 µL de la muestra a 200 µL de diluyente de muestra. Mezclar bien.

- Vierta 100 µL de suero diluido, calibrador y los controles en los pocillos correspondientes. Para el blanco de reactivo, dispensar 100 µL de diluyente de muestra en la posición A1. Elimine las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Retire el líquido de todos los pozos. Lavar los pocillos tres veces con 300 µL de buffer de lavado 1x. Secar en papel absorbente.
- Vierta 100 µL de enzima de conjugada a cada pocillo e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Retire la enzima conjugada de todos los pozos. Lavar los pocillos tres veces con 300 µL de buffer de lavado 1x. Secar en papel absorbente.
- Vierta 100 µL de sustrato TMB e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 100 µL de solución de paro.
- Leer D.O. a 450 nm utilizando lector de ELISA en los siguientes 15 minutos. Se recomienda una longitud de onda dual con filtro de referencia de 600-650 nm.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Compruebe factor calibrador (CF) el valor en la botella. Este valor puede variar entre lotes. Asegúrese de revisar el valor de cada kit.
- Calcular el valor de corte: Calibrador D.O. x factor calibrador (CF).
- Calcular el índice de Ab (anticuerpos) de cada determinación dividiendo la DO de cada muestra por el valor de corte.

Ejemplo de resultados típicos:

Calibrador media de DO = 0.8

Calibrador Factor (CF) = 0.5

Valor de corte = $0.8 \times 0.5 = 0.400$

Control positivo O.D. = 1.2

Índice de Ab = $1.2 / 0.4 = 3$

Paciente muestra O.D. = 1.6

Índice de Ab = $1.6 / 0.4 = 4.0$

CONTROL DE CALIDAD

La ejecución de la prueba puede ser considerada válida siempre los siguientes criterios:

- Si la D.O. del calibrador es mayor que 0.250.
- El índice de Ab para el control negativo debe ser inferior a 0.9.
- El índice de Ab para el control positivo debe ser mayor que 1.2.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados de la prueba obtenidos con este equipo sirven sólo como una ayuda para el diagnóstico y deben interpretarse en relación al historial clínico del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos de diagnóstico.
- Las muestras con lipemia o hemólisis puede provocar resultados erróneos.

INTERPRETACIÓN

La siguiente pretende ser una guía para la interpretación de los resultados de las pruebas de dsDNA, se alienta a cada laboratorio a establecer sus propios criterios de interpretación de la prueba basado en muestras de su población.

ÍNDICE DE INTERPRETACION DE ANTICUERPOS

- <0.9 No se detecte ningún anticuerpo dsDNA por ELISA.
- 0.9-1.1 Positivos en el límite. Las pruebas de control se recomienda si está clínicamente indicado.
- > 1.1 Se detectó anticuerpos dsDNA por ELISA.

CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

142 muestras sericas con sospecha de enfermedades autoinmunes fueron testeados por ANTI-dsDNA y se comparo con con un metodo de ELISA comercial. 17 fueron positivos y 120 fueron negativos por ambos metodos (96% de acuerdo). Los resultados se muestran a continuación:

		dsDNA antibody ELISA		
		+	-	Total
Kit ELISA Referencia	+	17	3	20
	-	2	120	122
	Total	19	123	142

PRECISION

INTRA-ENSAYO

Suero	No. Replicas	Media	SD	CV (%)
1	16	1.76	0.09	5.11
2	16	0.81	0.05	6.20
3	16	0.24	0.02	8.33

INTER-ENSAYO

Suero	No. Replicas	Media	SD	CV (%)
1	10	1.49	0.11	7.38
2	10	1.1	0.09	8.18
3	10	0.28	0.03	10.7

REFERENCIAS

- Wong KH; Lawton JW; Cheng SK; Lee SS; Lau CS. Measurement of anti-dsDNA: a comparative study of two ELISA and the Crithidia assay. *Pathology* 1998; 30(1):57-61.
- Bootsma H; Spronk PE; Ter Borg EJ; Hummel EJ; de Boer G; Limburg PC; Kallenberg CG. The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(11):661-6.
- Takeuchi Y; Ishikawa O; Miyachi Y. The comparative study of anti-double stranded DNA antibody levels measured by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay in systemic lupus erythematosus. *J Dermatol* 1997; 24(5):297-300.
- Batinić D; Božićević M; Krstulović A; Bosnić D; Sentić M; Markeljević J; Malenica B; Čikeš N; Marušić M. Binding of anti-double stranded (ds) DNA-positive sera to denatured (d) DNA and synthetic poly[dA-dT] x poly[dA-dT] double stranded copolymer in an ELISA format. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34(4):343-7.
- Tomer Y; Viegas OA; Swissa M; Koh SC; Shoenfeld Y. Levels of lupus autoantibodies in pregnant SLE patients: correlations with disease activity and pregnancy outcome. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14(3):275-80.
- Avina-Zubieta JA; Galindo-Rodriguez G; Kwan-Yeung L; Davis P; Russell AS. Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies. *Lupus* 1995; 4(5):370-4.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS

1155 CHESS DRIVE No. 121

FOSTER CITY, CA 94404 USA