



DiaMetra



Anti dsDNA IgG

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro il dsDNA nel siero o plasma umano.

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO095

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Anti-dsDNA IgG è un test immunoenzimatico (ELISA) indiretto in fase solida sviluppato per la determinazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG diretti contro il dsDNA, presenti nel siero o plasma umano.

Il kit Anti dsDNA IgG è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il test Anti-dsDNA IgG è usato per la diagnosi iniziale del Systemic Lupus Erythematosus (SLE) e per le differenti diagnosi delle malattie dello SLE.

Oltre alla determinazione di alti titoli di Anticorpi Antinucleo (ANA), la determinazione degli autoanticorpi contro dsDNA è uno dei criteri ACR (American College of Rheumatology) per la diagnosi del Systemic Lupus Erythematosus (SLE). La determinazione della concentrazione degli anticorpi può essere utilizzata per monitorare il successo terapeutico e predire eventuali attacchi della malattia (SLE)

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti-dsDNA IgG si basa sul legame degli anticorpi IgG del siero o plasma con il dsDNA adsorbito sulla micropiastra. Gli anticorpi nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti si legano sulla superficie interna dei pozzetti. Dopo 30 minuti di incubazione la micropiastra viene lavata con tampone di lavaggio per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito. Una soluzione di immunoglobuline anti-human IgG coniugate con perossidasi di rafano riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni dsDNA immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione, l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante tampone di lavaggio. Si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG anti dsDNA presenti nel campione originale.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Anti dsDNA Standards (5 flaconi, 1,2 mL ciascuno)
Tampone fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%, siero umano
STD0 **REF DCE002/9506-0**
STD1 **REF DCE002/9507-0**
STD2 **REF DCE002/9508-0**
STD3 **REF DCE002/9509-0**
STD4 **REF DCE002/9510-0**

2. Controls (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)
Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%, siero umano

Controllo Negativo **REF DCE045/9501-0**

Controllo Positivo **REF DCE045/9502-0**

3. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)
Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)
Anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP),
BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%

REF DCE002/9502-0

5. Coated Microplate
(1 micropiastra breakable con dsDNA adsorbito)

REF DCE002/9503-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 0,26 g/L, perossido di idrogeno
0,05%

REF DCE004-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)
Tampone fosfato 0,2 M, proclin < 0,0015%

REF DCE054-0

8. Stop solution (1 flacone, 15 mL)
Acido solforico 0,15 M

REF DCE005-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit
Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare
Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 nm).

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione degli standard e dei controlli sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, gli Standards e i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.

- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La sodio-azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso**. A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si

raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

- Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate nella busta ben chiusa a 2-8°C.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Preparazione degli Standard (S₀,...,S₄)

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. Gli standard hanno approssimativamente le seguenti concentrazioni:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
AU/mL	0	15	30	60	240

7.2. Preparazione del campione

Le matrici di elezione per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA sono siero o plasma umano. Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent. Quindi 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare. Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Emolisi e presenza di bilirubina non hanno effetti evidenti sulla determinazione.

I Controlli sono pronti all'uso.

7.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10x) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

7.4. Procedimento

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.

Poiché è necessario operare in doppio, allestire due pozzetti per ogni punto della curva Standard (S₀-S₄), due

per ogni Controllo, due per ogni Campione ed una per il Bianco.

Reagente	Standard	Campione o Controlli	Bianco
Standard S ₀ -S ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 µL di wash solution diluita			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 µL di wash solution diluita			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco.			

8. RISULTATI

8.1. Curva Standard

Per Anti-dsDNA IgG il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti-dsDNA IgG. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

N	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
STD0	0.007	0.008	0.008	0.00	0.03	0.01	---
STD1	0.426	0.403	0.415	15.90	14.97	15.44	4.28
STD2	0.731	0.717	0.724	29.68	28.98	29.33	1.68
STD3	1.208	1.243	1.226	59.17	61.90	60.53	3.19
STD4	2.272	2.218	2.245	251.3	229.3	240.3	6.48

9. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti-dsDNA-IgG:

Anti-dsDNA IgG	[AU/mL]
Normale:	< 30
Elevato :	> 30

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di anticorpi Anti-dsDNA sierici.

9.1. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 36 sieri (di cui 15 positivi e 21 negativi) hanno mostrato una specificità del 95,24%.

9.2. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 36 sieri (di cui 15 positivi e 21 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 93,33%.

9.3. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-dsDNA IgG che può essere distinta dallo standard zero è di 0,42 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

9.4. Precisione e riproducibilità

9.4.1 Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 16 volte due diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva standard. La variabilità intra-assay è ≤ 3,4%

9.4.2 Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di due differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-Assay è ≤ 11,7%.

10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Condemi, Jhon J. The autoimmune disease. The Journal of the American Medical Association 1987, Vo 258 n 20 2920 - 2929
2. Reichlin, M., Van Venrooij, W. J.: Autoantibodies to UNRP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis. Clin. exp. Immunol. 1991; 83:286-90.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 25: 1271-1277, 1982.
4. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. Medical Clinics of North America 70: 237-261, 1986.
5. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arth Rheum 29: 457-460, 1986.
6. The first international standard for antibody to double stranded DNA. Annals of the Rheumatic Disease 198; Vo 47: 740 - 746
7. Homburger HA, et al: detection of Antinuclear antibodies, comparative evaluation of enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. Arch Pathol Lab Med 122:993-999 (1998)
8. Smeenk, R. et al. Avidity of Antibodies to dsDNA. Comparison of IFT on Crithidia Luciliae, FARR assay and PEG assay. The journal of Immunology 1982 Vo 128 n.1. 73 -78

Ed. 02/2011

DCM095-4

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufact: Via Giustozzi 35/35a, Z.I Paciana – 06034
FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742-24851
Fax 0039-0742-316197
E-mail:info@diametra.com



DiaMetra



Anti dsDNA IgG

for routine analysis

Quantitative determination of IgG class antibodies against dsDNA in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO095

INTENDED USE

Anti dsDNA IgG kit is an indirect solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) designed for the quantitative measurement of IgG class antibodies directed against dsDNA in human serum or plasma.

Anti dsDNA IgG is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Anti-dsDNA IgG test is used for initial diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and for diagnosis of SLE different diseases. Besides the determination of high titers of antinuclear antibody (ANA), the determination of autoantibodies against dsDNA is one of the ACR criteria (American College of Rheumatology) for the diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). The determination of the concentration of antibodies can be used to monitor treatment success and predict possible attacks of the disease (SLE)

2. PRINCIPLE

Anti-dsDNA IgG test is based on the binding of serum or plasma IgG antibodies on dsDNA coated on the microplates. The antibodies in calibrators, controls or prediluted patient samples bind into the inner surface of the wells. After a 30 minutes incubation the microplate is washed with wash buffer for removing non-reactive serum components.

An anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate solution recognizes the IgG class antibodies bound to the immobilized dsDNA antigens. After a 30 minutes incubation any excess of enzyme conjugate, which is not specifically bound, is washed away with wash buffer.

A chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation the color development is stopped by adding the stop solution. The solution color changes into yellow. The amount of color is directly proportional to the concentration of the anti-dsDNA IgG antibodies present in the original sample.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Anti dsDNA Standards (5 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0.1 M, NaN₃ < 0.1%, human serum

STD0	REF DCE002/9506-0
STD1	REF DCE002/9507-0
STD2	REF DCE002/9508-0
STD3	REF DCE002/9509-0
STD4	REF DCE002/9510-0

- Controls (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)
Phosphate buffer 0.1 M, NaN₃ < 0.1%, human serum

Negative Control	REF DCE045/9501-0
Positive Control	REF DCE045/9502-0

- Sample Diluent (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer 0.1 M, NaN₃ < 0.1%
REF DCE053-0
- Conjugate (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG conjugated with peroxidase, BSA 0.1%, Proclin < 0.0015%
REF DCE002/9502-0
- Coated Microplate
(1 breakable microplate coated with dsDNA)
REF DCE002/9503-0
- TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 0.26 g/L, hydrogen peroxide 0.05%
REF DCE004-0
- 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M, proclin < 0.0015%
REF DCE054-0
- Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 M
REF DCE005-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.
Microplates reader (450 nm)

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- All human source material used in the preparation of standards and controls for this product has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Standard and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents,

allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment it is your responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.

- Samples microbiologically contaminated should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. STORAGE CONDITIONS

- Store all the kit reagents at 2-8°C. Do not freeze. Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.

7. PROCEDURE

7.1. Preparation of the Standard (S₀,...,S₄)

The assay system is calibrated in relative arbitrary units. The standards have approximatively the following concentration:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
AU/mL	0	15	30	60	240

7.2. Preparation of the Sample

For determination of Anti-dsDNA antibodies, human serum or plasma are the preferred sample matrices.

All serum and plasma samples have to be prediluted with sample diluent 1 : 100. Therefore 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2 - 8 °C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Neither Bilirubin nor Hemolysis have significant effect on the procedure.

The Controls are ready to use.

7.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10x) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

7.4. Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).

As it is necessary to perform the determination in duplicate, prepare two wells for each of the five points of the standard curve (S₀-S₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample or Controls	Blank
Standard S ₀ -S ₄	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution.			
TMB substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank.			

8. RESULTS

8.1. Standard curve

For Anti-dsDNA IgG a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. However we recommend using a Lin-Log curve. First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Typical Results (example only)

The figure below shows typical results for Anti-dsDNA IgG. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

N	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
STD0	0.007	0.008	0.008	0.00	0.03	0.01	---
STD1	0.426	0.403	0.415	15.90	14.97	15.44	4.28
STD2	0.731	0.717	0.724	29.68	28.98	29.33	1.68
STD3	1.208	1.243	1.226	59.17	61.90	60.53	3.19
STD4	2.272	2.218	2.245	251.3	229.3	240.3	6.48

9. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-dsDNA tests:

Antibodies anti-dsDNA IgG	[AU/mL]
normal:	< 30
elevated:	> 30

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum Anti-dsDNA.

9.1 Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 36 sera (15 of them positive sera and 21 negative sera) showed a 95.24% specificity.

9.2 Sensitivity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 36 sera (15 of them positive sera and 21 negative sera) showed a 93.33% sensibility.

9.3 Detection limit

The lowest concentration of anti-dsDNA IgG that can be distinguished from zero standard is 0.42 AU/mL with a confidence limit of 95%.

9.4 Precision and Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 16 times two different sera with values in the range of standard curve. The within assay variability is ≤ 3.4%

9.4.2 Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate measurements of two different control sera with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is ≤ 11.7%.

10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Condemni, Jhon J. The autoimmune disease. The Journal of the American Medical Association 1987, Vo 258 n 20 2920 - 2929
2. Reichlin, M., Van Venrooij, W. J.: Autoantibodies to UNRP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis. Clin. exp. Immunol. 1991; 83:286-90.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 25: 1271-1277, 1982.
4. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. Medical Clinics of North America 70: 237-261, 1986.
5. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arth Rheum 29: 457-460, 1986.
6. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. Annals of the Rheumatic Disease 198; Vo 47: 740 - 746
7. Homburger HA, et al: detection of Antinuclear antibodies, comparative evaluation of enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. Arch Pathol Lab Med 122:993-999 (1998)
8. Smeenk, R. et al. Avidity of Antibodies to dsDNA. Comparison of IFT on Crithidia Luciliae, FARR assay and PEG assay. The journal of Immunology 1982 Vo 128 n.1. 73 -78

Ed 02/2011

DCM095-4

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Giustozzi 35/35a, Z.I Paciana –
06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742-24851
Fax 0039-0742-316197
E-mail:info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

ITSpiegazione dei simboli
símbolos**GB**

Explanation of symbols

FR

Explication des symboles

ES

Significado de los

**DE**

Verwendete Symbole

PT

Explicação dos símbolos

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
 	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intra-assy elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation