

# **IgG anti dsDNA**

**Enzyme Immunoassay (ELISA) for the  
quantitative/qualitative determination of  
IgG antibodies to dsDNA  
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF.: DSDNA.CE  
96 Tests

## IgG anti dsDNA

### A. INTENDED USE

The device DSDNA.CE is an Enzyme ImmunoAssay (ELISA) intended to be used for the quantitative/qualitative determination of IgG autoantibodies to double stranded DNA (dsDNA) in human plasma and sera.  
For in vitro diagnostic use only.

### B. INTRODUCTION

**Autoimmunity** is the failure of an organism to recognize its own constituent parts as *self*, which allows an immune response against its own cells and tissues. Any disease that results from such an aberrant immune response is termed an *Autoimmune Disease*.

Antibodies against dsDNA belong to the group of Anti Nuclear Antibodies (ANA) which appear in several rheumatoid diseases, in particular presence of autoantibodies to native double-stranded DNA is typical for the clinical picture of Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

Antibodies against dsDNA appear in the active phase of the SLE and their concentration is prognostic to the severity of disease. DsDNA autoantibodies quantification become really useful in the follow up of the therapy.  
Anti-dsDNA are present in approximately 90% of SLE patients.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with dsDNA. In the 1<sup>st</sup> incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti dsDNA IgG are captured, if present, by the solid phase.

After washing out all the other components of the sample, in the 2<sup>nd</sup> incubation bound anti dsDNA IgG are detected by the addition of anti hIgG antibody, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti dsDNA IgG antibodies present in the sample. IgG in the sample may be quantitated by means of a standard curve calibrated on WHO standard preparation for anti-dsDNA antibodies (Wo/80).

### D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

#### 1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 breakable wells coated with dsDNA in presence of bovine proteins. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

#### 2. Calibration Curve: CAL N° ...

6x2.0 ml/vial. Ready to use and blue colour coded.

The standard curve is produced from human *dsDNA IgG* positive plasma, calibrated on WHO standard preparation for anti-dsDNA antibodies (Wo/80) and ranges:

CAL1 = 0 IU/ml or Negative Control (NC)

CAL2 = 12.5 IU/ml

CAL3 = 25 IU/ml or Cut-Off control (CO)

CAL4 = 50 IU/ml

CAL5 = 100 IU/ml

CAL6 = 200 IU/ml or Positive Control (PC)

Contains human serum proteins, bovine proteins, Tris buffer pH 7.8 +/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

#### 3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

#### 4. Enzyme conjugate: CONJ

1x16ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgG, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

#### 5. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methylbenzidine (or TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.*

#### 6. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### 7. Specimen Diluent: DILSPD

2x60ml/vial. Ready to use and violet-blue color coded.

It contains bovine proteins, Tris buffer pH 7.8 +/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the samples.

#### 8. Plate sealing foils n°2

#### 9. Package insert n°1

### E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000, 100 and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C (+/-0.5°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

### F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from

strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips..
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips..
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

#### G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or

heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

#### H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

##### Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing. In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

##### Calibration Curve:

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

##### Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

*Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.*

##### Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

##### Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

##### Sample Diluent:

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

##### Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning **H statements:**

**H315** – Causes skin irritation.

**H319** – Causes serious eye irritation.

**Precautionary P statements:**

**P280** – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

**P302 + P352** – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

**P332 + P313** – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

**P305 + P351 + P338** – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

**P337 + P313** – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

**P362 + P363** – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

**I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT**

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).  
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.  
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid

carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

**L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS**

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
5. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturer's instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
6. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
7. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
8. Check that the micropipettes are set to the required volume.
9. Check that all the other equipment is available and ready to use.
10. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

**M. ASSAY PROCEDURE**

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

**Quantitative Procedure**

This method has to be used when a quantitation in IU/ml is required.

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Then dispense 100 µl of Calibrators in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.

**Important note:** Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 15 minutes**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 or B1 (mandatory).

#### Qualitative Procedure

This method has to be used when a qualitative result (neg/pos) is required.

- Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
- Place the required number of microwells in the microwell holder. Leave the A1 empty for the operation of blanking.
- Then dispense 100 µl of NC (CAL1) in B1+C1, 100 µl of CO (CAL3) in D1+E1+F1 and 100 µl of PC (CAL6) in F1. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
- Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.

**Important note:** Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1 blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well A1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 15 minutes**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 (mandatory).

#### General Important notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

#### N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators or Controls	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>45 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking or n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>45 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking or n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
<b>3<sup>rd</sup> incubation</b>	<b>15 min</b>
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme for **Quantitative** Analysis is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3										
B	BLK	CAL4	S4										
C	CAL1	CAL5	S5										
D	CAL1	CAL5	S6										
E	CAL2	CAL6	S7										
F	CAL2	CAL6	S8										
G	CAL3	S1	S9										
H	CAL3	S2	S10										

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator S = Sample

An example of dispensation scheme for **Qualitative** Analysis is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2											
B	NC	S3											
C	NC	S4											
D	CO	S5											
E	CO	S6											
F	CO	S7											
G	PC	S8											
H	S1	S9											

Legenda: BLK = Blank NC = CAL1 CO = CAL3 PC = CAL6

## O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 or NC 0 IU/ml	< 0.200 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 12,5 IU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 or CP 200 IU/ml	OD450nm > 1.000

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
<b>Blank Well</b> > 0.100	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
<b>CAL 1 or NC</b> <b>0 IU/ml</b> > 0.200 OD450nm after blanking  coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
<b>CAL 2</b> <b>12.5 IU/ml</b>  OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (e.g.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.

<b>CAL 6 or CP</b> <b>200 IU/ml</b>  < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.
---	--

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

## Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

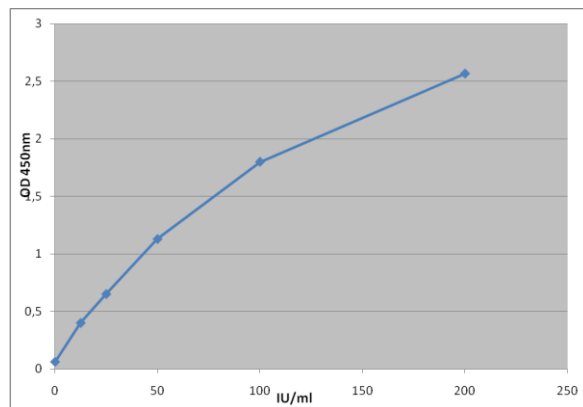
## P. RESULTS

If the test turns out to be valid proceed as follows.

### Quantitative Assay

Use an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti dsDNA IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



**Important Note:** Do not use the calibration curve above to make calculations.

### Qualitative Assay

Calculate the mean OD450nm/620-630nm of CO (CAL3) and consider for results the following formula:

$$\text{mean OD450nm/620-630nm CO} = \text{Cut-Off}$$

Then determine the value **S/Co (OD Sample<sub>450nm/620-630nm</sub>/Cut-Off)** of all the samples.

## Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 25 IU/ml or with a S/Co value < 1 are considered normal for anti dsDNA IgG antibody.

Samples with a concentration higher than 25 IU/ml or with a S/Co value > 1 are considered having an abnormally elevated presence of anti anti dsDNA IgG antibody.

Samples with a content in the range 12.5<IU/ml<25 IU/ml (or showing 0.5<S/Co<1.0) should be followed up.

IU/ml	Interpretation
< 25	Normal
> 25	Elevated

It is recommended anyway that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges.

**Important notes:**

1. Results of this test alone are not enough to provide a clear diagnosis of an autoimmune disease. Other diagnostic tests should be carried out, especially in combination with other autoantibodies. The pattern of different antibody combinations and their concentration together with the whole clinical picture of the patient are helpful diagnostic tools in the assessment of rheumatoid autoimmune diseases.
2. Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient.
3. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
4. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.

**R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples with reference to a CE marked reference kit.

**1. Limit of detection**

The limit of detection of the assay has been calculated by means of the I.G.S. calibrated on WHO standard preparation for anti-dsDNA antibodies (Wo/80), in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

The limit of detection has been calculated as mean OD450nm/620-630nm Calibrator 0 IU/ml + 5 SD.

The table below reports the mean OD450nm/620-630nm values of this standard when diluted and then examined in the assay.

IGS IU/ml	Lot P1 OD 450nm/620-630nm	Lot P1 OD 450nm/620-630nm
200	2.561	2.512
100	1.458	1.378
50	0.831	0.801
25	0.429	0.402
12.5	0.182	0.138
0	0.030	0.029

**2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:**

The diagnostic sensitivity has been tested in a Performance Evaluation trial on panels of samples classified positive by a CE marked reference kit.

The diagnostic **sensitivity** was studied on at least 50 samples, positive with the reference kit. Positive samples were collected from patients with a clinical history of autoimmune disease.

The diagnostic **specificity** was determined on panels of more than 50 negative samples from normal individuals and blood

donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The anti-dsDNA IgG test kit is specific only for autoantibodies directed to the respective antigen. No cross-reactivity have been observed.

The Performance Evaluation provided the following values:

<b>Sensitivity</b>	≥ 98 %
<b>Specificity</b>	≥ 98 %

**3. Precision:**

A study conducted on three samples of different anti IgG dsDNA reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs has shown CV% values ranging 4-20% depending on the OD450nm/620-630nm readings.

**4. Accuracy**

The assay accuracy has been checked by the dilution. Any "hook effect", underestimation likely to happen at high doses of analyte, was ruled out.

**S. LIMITATIONS**

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an autoimmune disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population.

**REFERENCES**

1. A new ELISA for the detection of double-stranded DNA antibodies. W Emlen, P Jarusiripipat, G Burdick - Journal of immunological methods, 1990 - ncbi.nlm.nih.gov.
2. Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies. JA Avina-Zubieta, G Galindo-Rodriguez, L ... - Lupus, 1995 - lup.sagepub.com.
3. Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. R Smeenk, M Hylkema - Molecular biology reports, 1993 - Springer.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with EN ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy









# IgG anti dsDNA

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la  
determinación cuantitativa/cualitativa de  
autoanticuerpos IgG frente a ADN  
bicatenario en plasma y suero humanos**

- uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

correo electrónico: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

## IgG anti ADN bicatenario

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO

El equipo DSDNA.CE es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) cuyo uso está destinado a la determinación cuantitativa/cualitativa de auto-anticuerpos IgG frente a ADN de doble cadena (dsDNA) en plasma y suero humanos.

Uso exclusivo para diagnóstico in vitro.

### B. INTRODUCCIÓN.

La **autoinmunidad** es el fallo de un organismo para reconocer sus partes constituyentes como *propias*, lo que permite una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Toda enfermedad causada por esa respuesta inmunitaria aberrante se denomina *enfermedad autoinmune*.

Los anticuerpos contra dsDNA pertenecen al grupo de anticuerpos antinucleares (ANA) que aparecen en varias enfermedades reumatoides, en particular la presencia de autoanticuerpos frente a ADN de doble cadena es típico en el cuadro clínico del Lupus eritematoso sistémico (LES).

Los anticuerpos contra dsDNA aparecen en la fase activa del LES y su concentración es un pronóstico de la gravedad de la enfermedad. La cuantificación de autoanticuerpos frente a dsDNA es realmente útil en el seguimiento de la terapia.

Los anticuerpos anti-dsDNA están presentes en aproximadamente el 90% de los pacientes con LES.

### C. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con ADN bicatenario. En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y las IgG anti ADN bicatenario son capturadas, si las hay, por la fase sólida.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan las IgG anti ADN bicatenario unidas por la adición de anticuerpo anti hlgG, marcado con peroxidasa (HRP).

El enzima capturado en la fase sólida, combinado con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti ADN bicatenario presentes en la muestra. Puede cuantificarse la cantidad de IgG en la muestra por medio de una curva estándar calibrada en una preparación estándar de la O.M.S. para anticuerpos anti ADN bicatenario (Wo/80).

### D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

#### 1. Microplaca: **MICROPLACA**

12 tiras x 8 pocillos rompibles recubiertos con ADN bicatenario en presencia de proteínas de bovino. Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Dejar la microplaca a temperatura ambiente antes de abrirla, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 4 °C.

#### 2. Curva de calibración: **CAL N° ...**

6x2.0 ml/vial. Listo para el uso y codificado con color azul.

La curva estándar se deriva de plasma humano positivo a IgG contra ADN bicatenario, calibrado en una preparación estándar de la O.M.S. para anticuerpos anti-ADN bicatenario (Wo/80) y oscila entre:

CAL1 = 0 IU/ml o Control negativo (CN)

CAL2 = 12,5 IU/ml

CAL3 = 25 IU/ml o Control de corte (CO)

CAL4 = 50 IU/ml

CAL5 = 100 IU/ml

CAL6 = 200 IU/ml o Control positivo (CP)

Contiene proteínas de suero humano, proteínas de bovino, tampón Tris pH 7,8 +/-0,1, además azida sódica al 0,09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes.

#### 3. Solución de lavado concentrada: **WASHBUF 20X**

1x60 ml/botella solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7,0 +/-0,2, Tween 20 al 0,05% y Proclin 300 al 0,045%.

#### 4. Conjugado: **CONJ**

1x16 ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales de cabra anti IgG humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10 mM a pH 6.8 +/-0.1, ProClin 300 al 0,045% y sulfato de gentamicina 0.02% como conservantes.

#### 5. Cromógeno/sustrato: **SUBS TMB**

1x16 ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0,03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,02%.

*Nota: Debe almacenarse en un lugar protegido de la luz ya que es sensible a la iluminación intensa.*

#### 6. Ácido sulfúrico: **H2SO4 0.3 M**

1x15 ml/vial. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### 7. Diluyente de muestras: **DILSPE**

2x60ml/vial. Listo para el uso y codificado con color violeta.

Contiene proteínas de bovino, tampón Tris pH 7,8 +/-0,1, además azida sódica al 0,09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. Utilizar para diluir las muestras.

#### 8. Sellador adhesivo n.º 2

#### 9. Manual de instrucciones n.º 1

### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar los oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubadora termostática de microplacas ELISA calibrada (en seco o húmedo), ajustada a +37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia).
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo solo debe ser utilizado por personal técnico adecuadamente formado e instruido, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y

como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.

4. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.

5. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2 y 8 °C en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.

6. No intercambiar componentes de lotes distintos. ni tampoco de dos equipos del mismo lote.

7. Comprobar que los reactivos estén limpios y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.

8. Evitar la contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.

9. Evitar la contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.

10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y en las etiquetas del envase externo. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos empleándolos hasta seis veces y en uso por un período de hasta 3 meses.

11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben manipularse de acuerdo con el nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE.UU., de conformidad con lo publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

12. Se recomienda utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados a fin de evitar la contaminación cruzada.

13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben eliminarse según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del proceso de lavado, de restos de controles y de muestras deben tratarse como potencialmente infecciosos e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10 % durante 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

14. En caso de derrame accidental de algún producto, debe utilizarse papel absorbente empapado en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.

16. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo, puntas usadas en las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como si se tratase de fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las leyes relativas al tratamiento de residuos de laboratorio.

## G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o el plasma según la técnica estándar para preparación de muestras del laboratorio de análisis

clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.

2. Evitar la adición de conservantes a las muestras, en particular azida sódica, ya que podría afectar a la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.

3. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados.

4. Las muestras hemolizadas (color rojo) y visiblemente hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben descartarse para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, partículas pesadas o filamentos y organismos microbianos.

5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2 °C y +8 °C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20 °C durante al menos 12 meses. Evitar congelar/descongelar cada muestra más de una vez, ya que pueden generarse partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.

6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

## H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

### Microplaca:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Comprobar que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación.

De ser así, llamar al servicio de atención al cliente de Dia.Pro.

Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8 °C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad incluido en la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

### Curva de calibración:

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

### Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse con cuidado antes de usarse. Durante la preparación, evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

*Nota: Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante una semana a temperaturas entre 2 y 8 °C.*

### Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

En caso de que deba transferirse el componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

### Cromógeno/Substrato:

Listos para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz intensa, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**Diluyente de muestras:**

Componente listo para el uso. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

**Ácido sulfúrico:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

**Frases H** de advertencia:

**H315** – Provoca irritación cutánea.

**H319** – Provoca irritación ocular grave.

**Consejos P** de prudencia:

**P280** – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

**P302 + P352** – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

**P332 + P313** – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

**P305 + P351 + P338** – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

**P337 + P313** – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

**P362 + P363** – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

**I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO**

- Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol doméstico, lejía al 10% y desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una exactitud de +/- 2%. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
- La incubadora ELISA debe ajustarse a +37 °C (+/- 0,5 °C de tolerancia) y controlarse periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua, siempre que estén homologados para la incubación de pruebas ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
- Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5 %.

- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro (620-630nm) obligatorio para reducir interferencias en la lectura. ( El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 nm; b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2,0; c) Linealidad ≥ 2,0; Reproducibilidad ≥ 1%. La lectura del blanco se lleva a cabo en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente, debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe instalarse en el sistema operativo de la unidad y corroborarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe homologarse y configurarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre causado por las agujas de dispensación y de lavado a fin de minimizar la posibilidad de contaminar los pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados ELISA cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente de Dia.Pro ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos usados en combinación con el equipo con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece apoyo para instalar nuevos instrumentos que se van a usar con el equipo.

**L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.**

- Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
- Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles a simple vista. Comprobar que el cromógeno/substrato sea incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico transparente. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.
- Esperar hasta que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora) y, a continuación, mezclar como se indica.
- Ajustar la incubadora de ELISA a +37 °C y preparar el lavador de ELISA cebando con la solución de lavado diluida, según las instrucciones del fabricante. Establecer el número correcto de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector ELISA se haya encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo, comprobar los ajustes y asegurarse de que se use el protocolo de ensayo correcto.
- Comprobar que las micropipetas estén ajustadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
- En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

## M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con las instrucciones que se indican a continuación, teniendo cuidado de mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

### Procedimiento cuantitativo

Este método debe utilizarse cuando se requiera cuantificación en IU/ml.

1. Diluir las muestras en una proporción 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (por ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir el juego de calibración ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.
2. Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para la operación de blanco.
3. Después dispensar 100 µl de calibradores por duplicado. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
4. Incubar la microplaca durante **45 min a +37 °C**.

**Nota importante:** las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se empleen instrumentos automatizados ELISA.

5. Lavar la microplaca con el lavador automático según se indica (sección I.3).
6. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en los pocillos de blanco A1+B1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo ha sido dispensado en todos los pocillos excepto el A1 y el B1.

**Nota importante:** tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

7. Incubar la microplaca durante **45 minutos a 37 °C**.
8. Lavar los micropocillos de igual forma que en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluidos los pocillos de blanco A1 y B1. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 15 minutos**.

**Nota importante:** no exponer directamente a fuerte iluminación, De lo contrario, se puede generar una actividad de fondo excesiva.

10. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico con la pipeta para detener la reacción enzimática en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos y las muestras positivas de azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (sustracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 o B1 (obligatorio).

### Procedimiento cualitativo

Este método debe utilizarse cuando se requiera un resultado cualitativo (neg/pos).

1. Diluir las muestras en una proporción 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (por ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir el juego de calibración ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos

los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.

2. Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte de micropocillos. Dejar el A1 vacío para la operación de lectura del blanco.
3. A continuación, dispensar 100 µl de CN (CAL1) en B1+C1, 100 µl de CO (CAL3) en D1+E1+F1 y 100 µl de CP (CAL6) en F1. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
4. Incubar la microplaca durante **45 min a +37 °C**.

**Nota importante:** las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se empleen instrumentos automatizados ELISA.

5. Lavar la microplaca con el lavador automático según se indica (sección I.3).
6. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo con la pipeta, excepto en el pocillo de blanco A1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo se haya dispensado en todos los pocillos excepto el A1.

**Nota importante:** tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

7. Incubar la microplaca durante **45 minutos a 37 °C**.
8. Lavar los micropocillos de igual forma que en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de mezcla de cromógeno/substrato con la pipeta en cada pocillo, incluido el pocillo de blanco A1. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 15 minutos**.

**Nota importante:** no exponer directamente a fuerte iluminación, De lo contrario, se puede generar una actividad de fondo excesiva.

10. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico con la pipeta para detener la reacción enzimática en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos y las muestras positivas de azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (sustracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (obligatorio).

### Notas importantes generales:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de interrupción y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos desde su adición. Se podría producir autooxidación del cromógeno causando una elevada actividad de fondo.

## N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Calibradores o controles	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20 segundos de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20 segundos de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
<b>3ª incubación</b>	<b>15 min</b>
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm / 620-630 nm

A continuación se ofrece un ejemplo del esquema de dispensación para análisis **cuantitativo**:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	S3										
B	BL	CAL4	M4										
C	CAL1	CAL5	M5										
D	CAL1	CAL5	S6										
E	CAL2	CAL6	S7										
F	CAL2	CAL6	S8										
G	CAL3	S1	M9										
H	CAL3	S2	S10										

Leyenda: BL = Blanco CAL = Calibrador M = Muestra

A continuación, se describe un ejemplo del esquema de dispensado para análisis **cuantitativo**:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M2											
B	CN	M3											
C	CN	M4											
D	CO	S5											
E	CO	S6											
F	CO	M7											
G	CP	M8											
H	M1	S9											

Leyenda: BL = Blanco NC = CAL1 CO = CAL3 CP = CAL6

## O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se realiza una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo, para verificar si el rendimiento del ensayo es el idóneo.

Controlar que los datos siguientes coinciden:

Comprobar	Requisitos
Pocillo de blanco	Valor < 0,100 DO 450 nm
CAL 1 o CN 0 UI/ml	Valor medio < 0,200 DO 450 nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
CAL 2 12,5 UI/ml	DO 450 nm > DO 450 nm CAL1 + 0,100
CAL 6 o PC 200 UI/ml	DO 450 nm > 1,000

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pasar a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Comprobar
<b>Pocillo blanco</b> > 0,100	1. que la solución cromógeno/substrato no se haya contaminado durante el ensayo;
<b>CAL 1 o CN 0 UI/ml</b> > 0,200 DO 450 nm después de leer el blanco  Coeficiente de variación > 30%	1. que el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación; 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y el lavador se ha alimentado con la misma antes del uso; 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo); 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas o al conjugado; 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado; 6. las agujas del lavador no están bloqueadas o parcialmente obstruidas.
<b>CAL 2 12,5 UI/ml</b>  DO 450 nm < DO 450 nm CAL1 + 0,100	1. el procedimiento se ha ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (p. ej.: dispensar un calibrador equivocado); 3. que el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
<b>CAL 6 o PC 200 UI/ml</b>  < 1,000 DO 450 nm	1. el procedimiento se ha ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (dispensar un calibrador equivocado); 3. que el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si se produce alguno de estos problemas, informar al responsable tras la comprobación para tomar las medidas pertinentes.

### Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

## P. RESULTADOS

Si la prueba resulta ser válida, proceder como se describe a continuación.

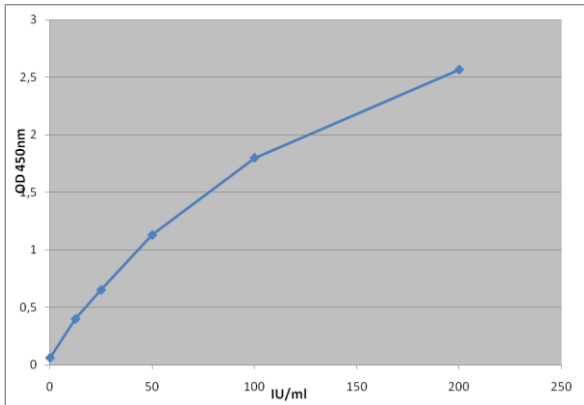
### Ensayo cuantitativo

Usar un programa aprobado de ajuste de curvas para trazar la curva de calibración a partir de los valores obtenidos con una lectura a 450 nm / 620-630 nm (se recomienda la interpolación de 4 parámetros).

Después, en la curva de calibración calcular la concentración de anticuerpo IgG anti ADN bicatenario en las muestras.



A continuación se describe un ejemplo de curva de calibración.



**Nota importante:** No usar la curva de calibración anterior para hacer cálculos.

#### Ensayo cualitativo

Calcular el valor medio de DO 450 nm / 620-630 nm de CO (CAL3) y considerar los resultados de la siguiente fórmula:

$$\text{medio DO 450 nm/620-630 nm CO} = \text{Valor de corte}$$

A continuación, determinar el valor de S/Co (**muestra DO 450 nm/620-630nm/CO**) de todas las muestras.

#### Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras con una concentración inferior a 25 IU/ml o con un valor S/Co < 1se consideran normales para anticuerpo IgG anti ADN bicatenario.

Las muestras con una concentración superior a 25 IU/ml o con un valor S/Co > 1se consideran una presencia anormalmente elevada de anticuerpo IgG anti ADN bicatenario.

Debe realizarse el seguimiento de las muestras con un contenido en el rango de 12,5<IU/ml<25 IU/ml (o que muestren un valor 0,5<S/Co<1,0).

UI/ml	Interpretación
< 25	Normal
> 25	Elevado

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios rangos normal y patológico.

#### Notas importantes:

1. Los resultados de esta prueba no son suficientes para proporcionar un diagnóstico claro de enfermedad autoinmune. Deben hacerse otros ensayos diagnósticos, especialmente en combinación con otros autoanticuerpos. El patrón de distintas combinaciones de anticuerpos y su concentración, junto con el cuadro clínico completo del paciente, son herramientas útiles de diagnóstico en la valoración de enfermedades autoinmunes reumatoides.
2. Los resultados positivos deben verificarse con respecto al estado clínico completo del paciente.
3. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
4. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.

#### R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento ha sido realizada en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia con marca CE.

##### 1. Límite de detección.

El límite de detección del ensayo ha sido calculado mediante el estándar de oro interno (I.G.S.) calibrado en una preparación estándar de la O.M.S. para anticuerpos anti-ADN bicatenario (Wo/80), con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo.

El límite de detección se ha calculado como valor medio de DO 450 nm / 620-630 nm de calibrador 0 UI/ml + 5 SD.

La tabla siguiente muestra los valores medios de DO 450 nm / 620-630 nm de este estándar cuando se diluye y se examina en el ensayo.

IGS UI/ml	Lote P1 OD 450nm/620-630nm	Lote P2 OD 450nm/620-630nm
200	2,561	2,512
100	1,458	1,378
50	0,831	0,801
25	0,429	0,402
12,5	0,182	0,138
0	0,030	0,029

##### 2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica ha sido ensayada en una prueba de evaluación del rendimiento en paneles de muestras clasificadas positivas por un equipo de referencia con marca CE.

La **sensibilidad** diagnóstica se estudió en al menos 50 muestras, positivas con el equipo de referencia. Las muestras positivas se obtuvieron de pacientes con una historia clínica de enfermedad autoinmune.

La **especificidad** clínica se determinó utilizando paneles de más de 50 muestras negativas, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante el equipo de referencia, incluidas muestras potencialmente interferentes.

También se empleó plasma sometido a distintos métodos de preparación estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero para determinar la especificidad. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas también se han probado para comprobar si la congelación interfiere con el rendimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

El equipo de IgG anti-ADN bicatenario es específico sólo para autoanticuerpos dirigidos al antígeno respectivo. No se ha observado reactividad cruzada.

En la evaluación del rendimiento se obtuvieron los siguientes valores:

<b>Sensibilidad</b>	≥ 98%
<b>Especificidad</b>	≥ 98%

##### 3. Precisión:

Se realizó un estudio con tres muestras de diferente reactividad IgG anti ADN bicatenario, examinadas en 16 réplicas, en tres tandas separadas. Los valores CV% obtenidos oscilan entre 4% y 20% según las lecturas de DO450nm.

##### 4. Precisión

La precisión del ensayo se ha comprobado por dilución. Se descartó cualquier "efecto gancho", subestimación con probabilidad de producirse a altas dosis de analito.

### S. LIMITACIONES

La contaminación bacteriana o la inactivación por calor de la muestra pueden afectar a los valores de absorbancia de las muestras y, por lo tanto, alterar los niveles del analito.

Las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados tras descongelarse pueden generar algunos resultados falsos.

El ensayo es útil solo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad autoinmune no debe establecerse en base a un solo resultado. Deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

Se ha evaluado falso positivo en menos del 2% de la población normal.

### BIBLIOGRAFÍA.

1. A new ELISA for the detection of double-stranded DNA antibodies. W Emlen, P Jarusiripipat, G Burdick - Journal of immunological methods, 1990 - ncbi.nlm.nih.gov.
2. Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies. JA Avina-Zubieta, G Galindo-Rodriguez, L - Lupus, 1995 - lup.sagepub.com.
3. Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. R Smeenk, M Hylkema - Molecular biology reports, 1993 – Springer.

Todos los productos IVD que fabrica la empresa están sujetos a control mediante un sistema de gestión de calidad certificado conforme con la norma EN ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se comercializa solamente si cumple las especificaciones técnicas y los criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italia





