

INTENCIÓN DE USO

El ds-DNA IgG Elisa es un sistema de detección Inmuno enzimático para la detección de anticuerpos anti ds-DNA en suero o plasma humanos.

RESUMEN Y APLICACIÓN

El anti ds-DNA se presenta entre el 50 y 70 % de los pacientes con lupus eritematoso (LET) el complejo inmune DNA/anti DNA es considerado parte importante en la patogénesis por (LET). La presencia de anti ds-DNA es considerado crítico en el diagnóstico de (LET) los anticuerpos IgG para ds-DNA son considerados y más usados en el diagnóstico y tratamiento de LET.

Los anticuerpos de atadura simple DNA (ds-DNA) y los anticuerpos IgM de DNA están fundamentados en el número de otras conexiones con enfermedades sobre todo hepáticas pudiendo ocurrir esto en algunos individuos normales. El método de Elisa es de elección para escrutinio de anti ds-DNA en pacientes con sospecha LET.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Al suero diluido del paciente es añadido a los pozos cubiertos con antígeno purificado, el anticuerpo específico IgG se encuentra presente atándose al antígeno todo aquel material que no se haya unido será lavado y desechado, la enzima conjugada será añadida para formar el complejo antígeno anticuerpo El exceso de la enzima conjugada es lavada y se añade el sustrato, el plato se incuba y se deja hasta que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato con la enzima. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos en la muestra.

ALMACENAMIENTO

Almacene el equipo entre 2°- 8°C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.

MATERIALES SUMINISTRADOS

MATERIALES PROVISTOS	96 PRUEBAS
1. Micropozos cubiertos con ds-ADN	12X8X1
2. Diluyente de muestra: 1 frasco	22ml.
3. Calibrador amarillo: 1 vial	1 ml.
4. Control positivo: 1 vial	1 ml.
5. Control negativo azul: 1 vial	1 ml.
6. Enzima conjugado: 1 frasco	12 ml.
7. Sustrato TMB: 1 botella	12 ml.
8. Solución paro HCL 1N	12 ml.
9. Solución lavadora conc. 20X	25 ml.

MATERIALES ADICIONALES NO PROVISTOS

1. Agua des ionizada o destilada
2. Pipetas de precisión
3. Puntillas desechables para micro pipeta
4. Micro lector de Elisa con longitud de onda a 450nm.
5. Papel absorbente
6. Papel para graficar.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Material potencialmente biopeligroso.
2. El suero y los calibradores son de origen humano fueron probados y no reaccionaron para hepatitis B antígeno de superficie también para anticuerpo HIV. Aprobados por la FDA. Sin embargo no existe un método que pueda ofrecer completa seguridad de ausencia de agentes infecciosos para virus de hepatitis B, HIV y otros agentes. Estos reactivos deben ser tratados con un nivel de bioseguridad nivel 2, recomendado por el centro de control nacional de enfermedades y en el manual para instituciones de salud bioseguridad microbiológica y laboratorios biomédicos 1984.
3. A fin de obtener resultados óptimos se recomienda seguir estrictamente el protocolo de la prueba, cuidar la precisión del pipeteo, el tiempo y temperatura indicadas ya que son requerimientos esenciales.
4. No pipetear con la boca, no fumar, comer o beber en las áreas en donde los reactivos y muestras sean manipulados.
5. Los componentes de este equipo deben ser utilizados en forma de unidad integral y los reactivos de diferentes lotes no deben ser mezclados.
6. El suero control y el diluyente de la muestra contienen conservador de acida de sodio, considerado potencialmente muy reactivo en contacto con el cobre y el plomo; o explosivo en contacto con el metal. Deseche con grandes volúmenes de agua.

RECOLECCIÓN DE MUESTRA Y MANIPULACIÓN

1. Recolectar la muestra de sangre y separarla del suero.
2. La muestra puede ser refrigerada entre 2-8° C por un periodo de 7 días o congelar por un periodo de 6 meses. Evite congelamientos repetitivos del suero de la muestra

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

1. Traer todas las muestras y reactivos para llevarlos a la temperatura ambiente (20-25°C) y mezclar gentilmente.
2. Preparar solución buffer a 1X agregando el contenido de la botella de 25 ml que está a 20X y llevarlos a 475 ml de agua desionizada o desnaturalizada.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Favor de cortar el número de tiras deseada
2. **El control negativo y positivo así como el calibrador están listos para usarse.** Preparar una dilución de las muestras 1:21 agregando 10 µl de la muestra a 200 µl de diluyente de la muestra.
3. Dispensar 100 µl de suero diluido, calibrador y controles dentro de los pozos adecuados, para el reactivo blanco dispensar 100 µl de diluyente de la muestra en la posición 1ª de los micropozos, golpear levemente el pozo para remover las burbujas que se encuentran mezcladas con la solución. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente
4. Remover el líquido de los pozos repetir el tiempo de lavado por tres veces con 300 µl de solución buffer.(1X)
5. Agregar 100 µl de la enzima conjugada cada pozo incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Remover la enzima conjugada de los pozos repetir el tiempo de lavado en tres tiempos con 300 µl de solución buffer(1X)
7. Agregar 100 µl de TMB solución sustrato e incubarlo por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregar 100 µl de solución paro.
9. Leer O.D. estable durante 15 minutos a 450 nm usando un micro lector. En lectores duales se recomienda la referencia entre 600-650 nm.

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRÍTICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARÁ COMO RESULTADO IMPRECISIÓN O LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Checar el factor de calibración (CF) valorado en la botella del frasco este valor puede ser que varíe de lote a lote marque y cheque con seguridad en cada equipo
2. Calcular el punto de corte valuado. Calibrador El OD del calibrador por el factor de calibración.
3. Calcular el anticuerpo catalogado (index) por cada determinación, por división del OD. Valuado por cada punto de corte de la muestra valuada.

EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Calibrador OD = 0.8
 Factor de calibración = 0.5
 Punto de corte valuado = $0.8 \times 0.5 = 0.400$
 Control positivo OD=1.2
 Anticuerpo (Índex)= $1.2/0.4=3$
 Muestra del paciente OD = 1.6
 Anticuerpo (Índex) $1.6/0.4= 4.0$

CONTROL DE CALIDAD

1. Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico
2. El OD. Del calibrador debe considerarse por arriba de 0.250
3. El Anticuerpo (Índex) para control negativo debe ser por debajo de 0.9
4. El anticuerpo (Índex) para control positivo debe ser superior al 1.2

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente está planeado como guía para la interpretación de los resultados de ds-DNA por IgG cada laboratorio se encargará de establecer un criterio para la interpretación basándose en las muestras populares encontradas.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS (índex)

<0.9 anticuerpo no detectado de ds-DNA por ELISA.
 0.9-1.1 sobre el límite positivo se recomienda otra identificación
 >1.1 anticuerpo detectado de ds-DNA Por Elisa.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos en el ensayo de ds-DNA solo sirven como auxiliar en el diagnóstico de la enfermedad y solo debe ser interpretada en relación con el historial clínico y físico del paciente y corroborado con otro método de diagnóstico.
2. Las muestras hemolizadas o lipemias pueden causar error.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

1. Sensibilidad y especificidad

142 sueros de pacientes fueron probados por ds-DNA ELISA en IgG 17 sueros fueron positivos y 120 sueros negativos por combinación de métodos (96% acordado) arrojaron los siguientes resultados.

Referencia Equipo De Elisa	ds-DNA anticuerpo		
	+	-	Total
+	17	3	20
-	2	120	122
Total	19	123	142

2. Precisión

Intra ensayo

Suero	No replicas	Supuestos	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	16	1.76	0.11	5.11
2	16	0.81	0.09	6.20
3	16	0.24	0.03	8.33

REFERENCIAS

1. Wong KH; Lawton JW; cheng SK; Lee SS; Lau Cs Measurement of anti-dsDNA
2. Bootama H; Spronk Pe; ter Borg EJ; Hummel Ej, de Boer G; Limburg Pc.
3. Takeuchi Y; Ishikawa O; Miyachi Y The comparative study of anti-double stranded DNA antibody levels measured by radio immunoassay and ELISA
4. Batinić D; Božićević M; krstulović D; sentić M; Markeljević J; malenica B, Cike N.
5. tomer y; viegas OA; Swissa M; Koh SC. Shoenfeld.

Distribuido por:
 Grupo Industrial MexLab S.A. de C.V.
 01800-111-4343
 www.grupomexlab.com