

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

## Verwendungszweck

Dieser Kit dient zur *in-vitro* Bestimmung spezifischer, hoch-avider IgG-Autoantikörper gegen doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (dsDNA) in Humanserum. Dieser Test soll zusammen mit anderen serologischen und klinischen Befunden bei der Diagnosestellung von Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) helfen. Der Kit enthält ausreichend Material, um maximal 40 Proben in Doppelbestimmung oder 88 Proben in Einzelbestimmung, sowie eine Kalibrationskurve, Positiv-, Negativ- und DNA-Einzelstrangkontrollen zu messen.

## Informationen zum Test

Die Verwendung von anti-dsDNA-Antikörper als diagnostischer Marker und zur Verlaufskontrolle der Krankheitsaktivität bei SLE hat seit der erstmaligen Beschreibung von Ceppellini *et al* im Jahr 1957<sup>2</sup> den behandelnden Ärzten<sup>1</sup> große Verbesserungen gebracht. Diese Erkenntnisse wurden 1982 bestätigt, indem sie vom American College of Rheumatology in die überarbeiteten Klassifikationskriterien für SLE<sup>3</sup> aufgenommen wurden.

Es werden heute drei allgemeine Testmethoden eingesetzt, die sich darin unterscheiden, dass anti-dsDNA-Antikörper unterschiedlicher Avidität erfasst werden<sup>4</sup>. Enzym-Immunoassays (ELISA), die es in verschiedenen Varianten gibt, erfassen in der Regel Antikörper von sehr unterschiedlicher Avidität. In der indirekten Immunfluoreszenz (IFT) mit *Crithidia luciliae* werden Antikörper mit niedriger Avidität auch miterfasst, wohingegen im Farr Radioimmunoassay (RIA)<sup>5</sup> nur die hoch-aviden Antikörper erfasst werden, da aufgrund eines Fällungsschrittes mit Ammoniumsulfat die niedrig-aviden Antikörper entfernt werden.

Bei dem HA dsDNA-Test wurden stringenter Testbedingungen gewählt<sup>8</sup>, wodurch die nur schwach bindenden niedrig-aviden Antikörper entfernt werden.

In einigen Studien<sup>6,7</sup> konnte ein Zusammenhang zwischen der Antikörper-Avidität und der Krankheitsprogression gezeigt werden, wobei die Wahl der Testmethode die Unterscheidung zwischen Patienten mit einer benignen Form des SLE und solchen mit Haut- und Nierenbeteiligung, besonders bei einer Lupus-Nephritis<sup>8,9</sup>, erleichtert.

Im allgemeinen zeigen alle Methoden bei Seren von Patienten mit bestätigtem systemischen Lupus erythematoses (SLE) eine gute Übereinstimmung, aber eine signifikante Varianz bei Patienten mit inaktivem SLE, oder bei Patienten, die nicht der Standardklassifikation von SLE entsprechen.

## Testprinzip

Die Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatten sind mit dsDNA-Antigen aus Kalbsthymus beschichtet. Die Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Patientenproben werden in den Vertiefungen inkubiert, so dass in diesem ersten Inkubationsschritt dsDNA-Autoantikörper an das immobilisierte Antigen binden können. Nach dem Waschen der Vertiefungen - um ungebundenes Protein zu entfernen - wird Peroxidase-markiertes Ziege anti-Human-IgG-Konjugat zugegeben. Das Konjugat bindet an die gebundenen humanen Autoantikörper. Ungebundenes Konjugat wird durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Das gebundene Konjugat wird mit Hilfe von 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) sichtbar gemacht. TMB ergibt ein blaues Reaktionsprodukt, dessen Intensität proportional zur Autoantikörper-Konzentration der Probe ist. Um die Reaktion zu stoppen, wird in jede Vertiefung Schwefelsäure pipettiert. Das daraus resultierende gelbe Reaktionsprodukt wird bei 450nm gemessen.

## Inhalt der Testpackung

1. Mikrotiter-ELISA-Platte beschichtet mit dsDNA Antigen aus Kalbsthymus (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter in Folienverpackung und Trockenmittel
2. ELISA Negative Kontrolle, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum ohne humane Antikörper gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
3. HA dsDNA ELISA Kalibrator A, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
4. HA dsDNA ELISA Kalibrator B, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
5. HA dsDNA ELISA Kalibrator C, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
6. HA dsDNA ELISA Kalibrator D, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
7. HA dsDNA ELISA Kalibrator E, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
8. HA dsDNA Positiv Kontrolle, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen dsDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
9. Type III Sample Diluent (Probendiluens Typ III), 2 Flaschen – gelb gefärbt mit Tween 20, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 50mL
10. HA dsDNA Waschkonzentrat, 2 Flaschen mit 10 fachem Konzentrat – farblos, enthalten Tween 20 und Stabilisator, 50 mL. Zur Verdünnung bitte das entsprechende Kapitel in der Anleitung beachten
11. HA dsDNA-Einzelstrangkontrolle, 1 Flasche mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen ssDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
12. HRP HA dsDNA IgG Konjugat, anti-humanes IgG, 1 Flasche – blau gefärbt mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 10 mL
13. TMB Chromogen, 1 Flasche mit Stabilisatoren, 10 mL
14. HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure, 1 Flasche – farblos, 10 mL

## Hinweise

1. VORSICHT: Probenverdünner, Kontrollen, Probendiluens und Konjugat enthalten 0,02% Chloramphenicol. Es ist im US-Bundesstaat Kalifornien und allgemein bekannt, daß dieser Stoff Krebs verursachen kann. Wasch und Probendiluens mit Proclin150. Enthält ein Reizmittel, das bei Inhalation, Einnahme oder Absorbition durch die Haut gesundheitliche Schäden verursachen kann. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
2. Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.<sup>12</sup>
3.  $\text{NaN}_3$  wird als Stabilisator verwendet.  $\text{NaN}_3$  ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.
4. Das HRP Konjugat enthält eine verdünnte Chemikalie, die bei Einnahme toxisch wirken kann. Daher den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
5. Das TMB Chromogen enthält ein Reizmittel, das bei Inhalation, Einnahme oder Absorbition durch die Haut gesundheitliche Schäden verursachen kann. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
6. Die HRP Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Den Kontakt mit Basen, Metallen und anderen Stoffen, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Schwefelsäure ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen hervorrufen. Den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
7. Die vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung während der Arbeit mit Reagenzien tragen.
8. Verschüttete Reagenzien sofort beseitigen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle Umweltvorschriften beachten.

## Vorsichtsmaßnahmen

1. Dieser Test ist für "In-Vitro Diagnostik".
2. Dieser Test sollte nur von entsprechend geschultem Laborpersonal durchgeführt werden.
3. Testdurchführung strikt nach Arbeitsanleitung. Jegliche Abweichung kann die Testqualität und Ergebnisse beeinflussen. Beachten Sie die spezifischen ‚Hinweise‘ und Warnungen in dieser Arbeitsanleitung.
4. Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen **NICHT** untereinander gemischt oder gemeinsam verwendet werden. Bei großem Testdurchsatz muss darauf geachtet werden, dass alle Reagenzien der **GLEICHEN** Charge entstammen. Alle Mikrotiterstreifen müssen aus demselben Folienbeutel entnommen werden. Der Austausch einer Testkomponente kann inkorrekte Ergebnisse zur Folge haben.
5. Zur Vermeidung von Kontaminationen der Reagenzien immer saubere Plastik- oder Glasgefäße verwenden. **Niemals** unbenutztes Reagenz in die Flaschen zurückgeben.
6. Reagenzienflaschen nicht für längere Zeit offen stehenlassen. Die daraus resultierende Verdunstung oder Verunreinigung führt zu widersprüchlichen Ergebnissen.
7. TMB darf weder mit Licht noch mit Wasser in Berührung kommen!
8. Die Verwendung von mikrobiell oder mit Partikeln verunreinigter, hämolytischer oder lipämischer Seren vermeiden.
9. Es wird empfohlen kalibrierte Pipetten und geeignete interne Kontrollen zu verwenden.
10. Die Verwendung von ELISA-Automaten, Pipettierautomaten oder anderen automatisierten Geräten kann im Vergleich zur manuellen Testdurchführung zu abweichenden Ergebnissen führen. Jedes Labor muss das System vollständig validieren und sicherstellen, dass die Ergebnisse innerhalb des in dieser Arbeitsanleitung und dem beigefügten QC-Zertifikat Spezifikationen liegen.
11. Die verwendeten Geräte und Pipetten müssen gemäß der Herstellerangaben kalibriert und gewartet werden.

## Lagerung

1. Den Kit bei 2-8°C lagern, **nicht** einfrieren. Lagerung bei falscher Temperatur beeinflusst die Ergebnisse.
2. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C für eine Wochen.
3. Die Haltbarkeit des Kits wird auf dem Außenetikett angegeben.

## Proben

1. Blutproben über Venenpunktur sammeln und auf natürliche Weise gerinnen lassen. Serum vom Gerinnsel trennen.
2. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 7 Tage vor dem Test gelagert werden<sup>10</sup>. Für eine längere Lagerung empfiehlt es sich, die Seren unverdünnt und aliquotiert bei mindestens -20°C einzufrieren.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden.
4. Serumproben **nicht** hitzeinaktivieren, dies kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

## Testdurchführung

### In der Testpackung vorhandenes Material

- **Arbeitsanleitung:** mit genauen Angaben zur Testdurchführung.
- **QC-Zertifikat:** mit Angaben zu den Kontroll-Sollwerten und ideale Kalibrationskurve.
- **dsDNA Mikrotiterstreifen:** 12 Mikrotiterstreifen mit 8 vereinzelbaren Vertiefungen, mit dsDNA Antigen aus Kalbsthymus beschichtet sind. Die Streifen sind in einem wiederverschließbaren Folienbeutel, der zwei Beutel mit Trockenmittel enthält, verpackt.
- **Proben-Diluens Typ III:** 2 Flaschen mit je 50mL gebrauchsfertigem Puffer zur Probenverdünnung. Farb-codierung: Gelb
- **Waschkonzentrat HRP (10X):** 2 Flaschen mit 50mL eines 10-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Vertiefungen.
- **HA dsDNA-Kalibratoren:** 5 Flaschen, mit je 1,2mL verdünntem Humanserum mit den folgenden Konzentrationen an anti-dsDNA-Autoantikörpern: 1000; 333; 111; 37; 12,3 IU/mL. Gebrauchsfertig.

- **HAdsDNA-Positivkontrolle:** 1 Flasche mit 1,2mL verdünntem Humanserum. Der Sollwert ist auf dem QC-Zertifikat angegeben. Gebrauchsfertig.
- **ELISA Negativkontrolle:** 1 Flasche mit 1,2mL verdünntem Humanserum. Der Sollwert ist auf dem QC-Zertifikat angegeben. Gebrauchsfertig.
- **HA dsDNA-Einzelstrangkontrolle:** 1 Flasche mit 1,2mL verdünntem Humanserum. Der Sollwert ist auf dem QC-Zertifikat angegeben. Gebrauchsfertig.
- **HA dsDNA HRP IgG-Konjugat:** 1 Flasche mit 10mL gereinigtem, Peroxidase-markiertem Antikörper gegen Human-IgG. Farbcodierung: blau. Gebrauchsfertig.
- **TMB Chromogen:** 1 Flasche mit 10mL TMB-Lösung. Gebrauchsfertig.
- **Stopp-Lösung HRP:** 1 Flasche mit 10mL 0,344M Schwefelsäure. Gebrauchsfertig.

## Zusätzliches benötigtes Material

- **Automatisches Mikrotiterplatten-Waschgerät:** ist empfehlenswert, aber die Platten können auch manuell gewaschen werden.
- **Mikrotiterplatten-Reader:** Messung der optischen Dichte in den Vertiefungen bei 450nm.
- **Destilliertes oder deionisiertes Wasser:** Es sollte von höchster Qualität und frei von Metallionen sein.
- **Kalibrierte Mikropipetten:** Zum Pipettieren von 1000, 100 & 10 $\mu$ L.
- **Mehrkanal-Pipette:** Zum Pipettieren von Volumina von 100 $\mu$ L (Konjugat, Substrat und Stopp-Lösung).
- **Glas- oder Plastikgefäße:** Zur Probenverdünnung.

## Methode

### Testvorbereitung

1. **Kit auf Raumtemperatur erwärmen:**
  - Die optimale Temperatur für die Testdurchführung liegt bei 20-24°C.
  - Den Kit nach Entnahme aus dem Kühlschrank ca. 60 Minuten auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Die Wells bis zum tatsächlichen Gebrauch in der Folie belassen und **nicht** vor Erreichen der Raumtemperatur entnehmen!

**Hinweis:** Der Kit kann bis zu 1 Woche bei Raumtemperatur gelagert werden.
2. **Kit-Komponenten**  
Jede Kit-Komponente vor Gebrauch kurz schütteln.
3. **Waschpuffer (10-fach-Konzentrat) verdünnen:**  
Dazu 100 mL Waschpuffer-Konzentrat und 900 mL destilliertes Wasser (1/10 Verdünnung) in ein sauberes Gefäß geben und mischen. Bei Bedarf können auch kleinere Mengen verdünnt werden. **HINWEIS:** Der verdünnte Puffer ist bei 2-8°C für 1 Woche; deshalb nur die benötigte Menge verdünnen.
4. **Verdünnung der Proben**  
10 $\mu$ L jeder Probe mit 1000 $\mu$ L Proben-Verdünnungspuffer verdünnen (1:100) und gut mischen. **Hinweis:** Die verdünnten Proben **müssen** innerhalb von 8 Stunden gemessen werden.
5. **Umgang mit Streifen und Rahmen**  
Die benötigte Anzahl Wells aus dem Folienbeutel entnehmen und in den Rahmen setzen. Dabei von Position A1 ausgehend die Spalten von links nach rechts auffüllen. Achten Sie darauf, die langen Seiten des Rahmens zusammenzudrücken, damit die Wells nicht herausfallen können. **Hinweis:** Um die Kontaktzeit mit der Luftfeuchtigkeit zu minimieren, die nicht verwendeten Wells sofort in den wiederverschließbaren Folienbeutel mit dem Trockenmittel geben und gut verschließen. Darauf achten, dass der Folienbeutel nicht beschädigt wird. **ACHTUNG: Kontakt mit Feuchtigkeit oder Verunreinigung durch Staub oder anderen Partikeln kann einen Antigen-Abbau verursachen. Daraus resultiert eine schlechte Präzision und potentiell falsche Ergebnisse.**

### Testdurchführung

1. **Pipettieren der Kalibratoren, Kontrolle und Proben**  
100 $\mu$ L von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und verdünnter Probe (1:100) in das dafür laut Plattenschema vorgesehene Well pipettieren. **HINWEIS:** Die Proben müssen so schnell wie möglich pipettiert werden; die Inkubationszeit läuft ab Zugabe der **letzten** Probe. **30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.**
2. **Waschen der Platte**  
Sorgfältiges Waschen der Wells ist wichtig für eine hohe Präzision und genaue Testergebnisse. Bei nicht korrekt gewaschenen Wells können ungenaue Ergebnisse mit schlechter Präzision und hohem Hintergrund auftreten. Nach der Inkubation die Wells dreimal mit 200-300 $\mu$ L Waschpuffer waschen. Das Waschen kann mit einem automatischen Platten-Waschgerät oder manuell erfolgen. Nach dem letzten Waschschrift die Wells durch leichtes Klopfen auf eine absorbierende Unterlage (z.B. Papiertücher) trocknen. **Bei Verwendung von automatischen Mikrotiterstreifen-Waschgeräte sollte keine Standzeit einprogrammiert werden.**  
**Manuelles Waschen**
  - a. Den Inhalt der Wells in den Ausguss schütten, dabei die langen Seiten des Rahmens zusammendrücken.
  - b. Die Wells auf einer absorbierenden Unterlage (z. B. Papiertücher) leicht ausklopfen.
  - c. 200 - 300 $\mu$ L Waschpuffer in der Arbeitskonzentration in die Wells pipettieren.
  - d. Die Mikrotiterplatte auf einer flachen Unterlage stehend leicht schütteln.
  - e. Zweimaliges Wiederholen der Schritte a bis d.
  - f. Die Wells wie unter a und b entleeren.

**Lassen Sie den Waschpuffer nur solange in den Wells, bis alle Wells gefüllt sind.**
3. **Pipettieren des Konjugats**  
100 $\mu$ L Konjugat in jedes Well pipettieren. Die Ränder der Wells mit Filterpapier abtrocknen, um Spritzer zu entfernen. **Hinweis:** Um Verunreinigungen zu vermeiden, niemals überschüssiges Konjugat in die Konjugat-Flasche zurückgeben. **30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.**
4. **Waschen der Platte**  
Siehe Abschnitt 2.

**5. Pipettieren von Chromogen (TMB)**

Nach dem Waschen 100µL TMB in jedes Well pipettieren. Die Ränder der Wells mit Filterpapier btrocknen, um Spritzer zu entfernen.**Hinweis:** Um Verunreinigungen zu vermeiden, niemals überschüssiges TMB in die TMB-Flasche zurückgeben.**30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.**

**6. Reaktionsende**

100µL Stopp-Lösung in jedes Well pipettieren. Die Farbe schlägt von blau nach gelb um.

**7. Farbmessung**

Die optische Dichte (OD) bei 450nm in jedem Well mit einem Mikrotiterplatten-Reader innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

## Qualitätskontrolle

**1. Qualitätskontrolle**

Nur, wenn alle nachfolgend aufgeführten Kriterien erfüllt sind, ist der Test gültig.

- Kalibratoren und die Kontrollen (Positiv, Negativ, Einzelstrang) müssen bei jedem Testansatz mitgeführt werden.
- Das Ergebnis der Kontrollen muss in dem angegebenen Wertebereich (siehe QC-Zertifikat) liegen.
- Die berechnete Kalibrationskurve sollte der auf dem QC-Zertifikat abgebildeten Kalibrationskurve ähnlich sein.

**Ist dies nicht der Fall, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.**

**2. Berechnung der mittleren optischen Dichte (OD) (nur bei Doppelbestimmung):** Für jeden Kalibrator und jede Kontrolle und Probe die mittlere optischen Dichte (OD) der Doppelbestimmungen berechnen. Der Variationskoeffizient (%VK) der Doppelbestimmungen sollte jeweils unter 15% liegen.

**3. Erstellen der Kalibrationskurve**

Die Kalibrationskurve kann entweder automatisch oder manuell erstellt werden. Dazu wird die anti-dsDNA-Autoantikörper-Konzentration auf der logarithmischen Skala gegen die OD-Werte auf der linearen Skala für jeden Kalibrator aufgetragen.

- Automatisch: Geeignete, validierte Software verwenden. Kalkulationsmodus verwenden, der am besten zu den Daten passt.
- Manuell: Halblogarithmisches Millimeterpapier verwenden, eine Ausgleichs-kurve durch die Punkte legen (keine Gerade oder Punkt-zu-Punkt-Verbindung).

**4. Umgang mit abweichenden Kalibrationspunkten**

Liegt ein Messpunkt nicht auf der Kalibrationskurve, so kann er weggelassen werden. Der Test sollte wiederholt werden, wenn die daraus resultierende Kalibrationskurve deutlich von der im QC-Zertifikat angegebenen Kurvenform abweicht oder, wenn mehrere Kalibrationspunkte zu starke Abweichungen aufweisen.

**5. Berechnung der Autoantikörper-Konzentrationen in den Kontrollen und verdünnten Proben**

Die anti-dsDNA-Autoantikörper-Konzentrationen der Kontrollen und verdünnten Proben direkt aus der Kalibrationskurve ablesen. Die Kontrollwerte müssen in den im QC-Zertifikat angegebenen Bereich fallen.

**Hinweis:** Die Standard-Probenverdünnung von 1:100 ist in der Kalibrationskurve bereits berücksichtigt. Es sind keine weiteren Berechnungen nötig.

**6. Kalibration des Tests**

Der Test ist in IU/mL gegen den Referenzkalibrator Wo80 der WHO kalibriert<sup>6</sup>.

## Grenzen des Verfahrens

1. Mit diesem Test, der nur hoch-avide anti-dsDNA-Antikörper erfasst, können einige Formen von SLE, bei denen die Patienten nur niedrig-avide Antikörper produzieren, als negativ gefunden werden. Daher kann der Test für solche Fälle, in denen die gesamte Population der anti-dsDNA-Antikörper erfasst werden soll, nicht eingesetzt werden.
2. Dieser Test dient nur zur Unterstützung der Diagnose. Ein positives Ergebnis ist ein Hinweis auf bestimmte Erkrankungen, es muss aber durch den klinischen Befund und andere serologische Untersuchungen bestätigt werden.
3. Die Testergebnisse können nicht als diagnostischer Beweis für das Vorliegen bzw. Nichtvorliegen einer Krankheit verwendet werden.

## Erwartungswerte

Die nachfolgenden Bereiche wurden anhand von Proben von 150 gesunden Blutspendern und 224 SLE-Patienten, mit FARRZYME ermittelt.

INTERPRETATION	
≤ 30 IU/mL	Negativ
> 30 IU/mL	Positiv

Bei allen 150 Blutspendern wurden Konzentrationen unterhalb von 17,0 IU/mL gefunden, wobei 146 (97%) unterhalb von 12,3 IU/mL, der unteren Nachweisgrenze des Tests, lagen. 22,8% der SLE-Seren waren im FARRZYME-Test positiv (>30 IU/mL).

In der nachfolgenden Tabelle ist eine Vergleichsstudie mit 224 SLE-Seren zwischen FARRZYME und einem konventionellen anti-dsDNA ELISA, der sowohl niedrig- als auch hoch-avide Antikörper erfasst, zusammengefasst. Proben, die in dem konventionellen anti-dsDNA ELISA ein grenzwertiges Ergebnis aufwiesen, wurden für die Berechnung der positiven und negativen Übereinstimmung und der gesamten Übereinstimmung, als negativ bewertet.

		Konventioneller anti-dsDNA ELISA		
		Positiv	Grenzwertig	Negativ
FARRZYME	Positiv	47	3	1
	Negativ	33	51	89

Positive prozentuale Übereinstimmung = 58,8%  
 Negative prozentuale Übereinstimmung = 97,2%  
 Gesamte Übereinstimmung = 83,5%

Mit dem Farr-RIA und dem FARRZYME-ELISA wurden bei 100 SLE-Patienten hoch-avide anti-dsDNA-Antikörper mit einer Häufigkeit von 36% bzw. 38% berichtet<sup>8</sup>. Bei 100 Patienten mit verschiedenen Bindegewebserkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen lag die Häufigkeit im Gegensatz hierzu bei 4% bzw. 5% in diesen beiden Methoden.

Die Messergebnisse in Einheiten, die mit dem FARRZYME Assay erhalten werden, müssen nicht mit den Werten anderer Assays, die in IU/mL angegeben werden, übereinstimmen. Die Ursache hierfür ist, dass dieser Assay nur die Subgruppe der hoch-aviden anti-dsDNA Antikörper misst.

Die oben angegebenen Werte dienen nur der Orientierung. ELISAs sind sehr sensitiv und in der Lage kleine Unterschiede in der ‚Probenpopulation‘ festzustellen. Daher wird empfohlen, dass jedes Labor auf der Basis der lokalen Population und der verwendeten Geräte und Techniken seinen eigenen Normalbereich ermittelt.

## Leistungsdaten

### 1. Messbereich

Der Messbereich dieses Kits ist 12,3 – 1000 IU/mL.

### 2. SENSITIVITÄT

Es wurde durch eine statistische Analyse (Student-t-Test) bestätigt, dass der FARRZYME-Test zwischen zwei Proben mit Konzentrationen im untersten Messbereich (120% bzw. 165% des niedrigsten Kalibrators) unterscheiden kann. Hierzu wurde jede Probe mehrfach gemessen.

### 3. SPEZIFITÄT UND ÜBEREINSTIMMUNG

189 Proben von SLE-Patienten wurden zusammen mit 35 Proben, die entweder auf Crithidien oder im ELISA dsDNA-positiv waren, und 28 Proben von gesunden Blutspendern mit dem FARRZYME, in dem IFT auf *Crithidia luciliae* und in einem konventionellen anti-dsDNA ELISA gemessen.

		Crithidia IFT	
		+	-
FARRZYME	+	37	14
	-	18	183
Positive Übereinstimmung %		67,3%	
Negative Übereinstimmung %		92,9%	
Gesamt-Übereinstimmung		87,3%	

Der FARRZYME ELISA zeigte eine gute Übereinstimmung bei den negativen Proben mit dem *Crithidia luciliae* IFT. Die positive Übereinstimmung war etwas erniedrigt, da in der IFT auch niedrig-avide anti-dsDNA-Antikörper, im Gegensatz zum FARRZYME-Test, erfasst werden<sup>11</sup>.

		Konventioneller dsDNA ELISA		
		+	Grenzwertig	-
FARRZYME	+	47	3	1
	-	33	51	117
*Positive Übereinstimmung %		58,8%		
Negative Übereinstimmung %		97,7%		
Gesamt-Übereinstimmung		85,3%		

\*Für die Berechnung der Übereinstimmung der beiden Tests, wurden die im konventionellen ELISA im grenzwertigen Bereich liegenden Proben als negativ eingestuft. Der konventionelle ELISA erfasst sowohl hoch- als auch niedrig-avide Antikörper, was zu einer reduzierten positiven Übereinstimmung mit der FARRZYME-Methode führt.

### 4. INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Verschiedene Serumtypen wurden getestet um mögliche Effekte von interferierenden Substanzen zu ermitteln. Hierzu wurde ein Interference Check A plus™ Kit (Kokusai, Japan) verwendet.

Substanz	Konzentration
Bilirubin F (Frei)	20,3mg/dL
Bilirubin C (Konjugiert)	20,2mg/dL
Hämolysiertes Hämoglobin	486mg/dL
Chylus	1460 Units
Rheumafaktor	45 IU/mL

Kein störender Einfluss wurde bei freiem oder konjugierten Bilirubin, Hämoglobin, Lipiden oder Rheumafaktoren gefunden.

In einer separaten Studie wurden 6 IgG-Myelomseren mit dem FARRZYME-Test gemessen und bei keiner dieser Proben wurde ein positives Ergebnis erhalten.

### 5. PRÄZISION

Die Intra- und Inter-Assay-Präzision wurden anhand von 6 Proben, deren Konzentrationen im Bereich der Kalibrationskurve lagen, ermittelt. Der Mittelwert und der Variationskoeffizient VK% sind nachfolgend für jede Probe aufgelistet.

Die Intra-Assay Präzision wurde durch 20-fache Messung in einem Assay bestimmt.

INTRA-ASSAY-PRÄZISION		
n = 20	Konzentration (IU/mL)	VK%
Probe 1	25,1	5,4
Probe 2	39,0	4,8
Probe 3	74,5	2,2
Probe 4	205,5	3,3
Probe 5	361,2	4,3
Probe 6	528,6	5,1

Für die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurde jede Probe in Doppelbestimmung in 6 verschiedenen Testansätzen über 3 Tage gemessen.

INTER-ASSAY-PRÄZISION		
n = 6	Konzentration (IU/mL)	VK%
Probe 1	24,6	13,5
Probe 2	42,3	3,9
Probe 3	61,3	11,6
Probe 4	123,2	4,9
Probe 5	272,4	7,0
Probe 6	474,1	6,9

### Plattenschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

### Kurzarbeitsanleitung

- 100µL von jedem Kalibrator und jeder Kontrolle und 1:100 verdünnten Proben in das entsprechende Well pipettieren.  
**30 Minuten inkubieren. Waschen.**
- 100µL Konjugat in jedes Well geben.  
**30 Minuten inkubieren. Waschen.**
- 100µL Substrat in jedes Well geben.  
**30 Minuten im Dunkeln inkubieren.**
- 100µL Stopp-Lösung in jedes Well pipettieren.  
**Absorption bei 450nm messen.**

## Referenzen

1. Isenberg D and Smeenk R. Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now? *Lupus*, 2002; **11**: 797-800.
2. Ceppelini R, Polli E and Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957; **96**: 572-574.
3. Tan *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism*, 1982; **25**:1271-7.
4. Riboldi P *et al.* Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity*. 2005; **38**: 39-45.
5. Werle E *et al.* The clinical significance of measuring different ant-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay and a crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus*, 1992; **1**: 369-377.
6. Isenberg D. Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus? *Lupus*, 2004; **13**: 881-885.
7. Nossent H C and Rekvig O P. Is closer linkage between systemic lupus erythematosus and anti-double-stranded DNA antibodies a desirable and attainable goal? *Arthritis Res Ther*, 2005; **7(2)**: 85-7.
8. Jaekel HP *et al.* Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus*, 2006; **15**: 1-11.
9. Renaudineau Y *et al.* Association of  $\alpha$ -actinin-binding anti-dsDNA antibody Protein Reference Unit Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A with lupus nephritis. *Arthritis Rheumatism*, 2006 (in press)
10. Protein Reference Unit Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004 Ed A Milford Ward. J. Sheldon, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.
11. Smeenk R, van der Lelij G and Aarden L. Measurement of low avidity anti-dsDNA by the Crithidia luciliae test and the PEG assay. *Clin Exp Immunol*, 1982; **49**: 603-610.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition.

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.  
9900 Old Grove Road  
San Diego, CA 92131  
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745  
Technical Service (Outside the U.S.) : 00+ 1 858-805-7950  
support@inovadx.com

Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80  
D-66386 St. Ingbert, Germany  
Tel.: +49-6894-581020  
Fax.: +49-6894-581021  
[www.mt-procons.com](http://www.mt-procons.com)

624615DEU

May 2011  
Revision 2

