

einzel strand DNA

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

Verwendungszweck

QUANTA Lite™ ssDNA ist ein „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für die semi-quantitative Bestimmung von anti-Einzelstrang DNA (ssDNA) Autoantikörpern. Der INOVA QUANTA Lite™ ssDNA ELISA Test ist in Verbindung mit dem INOVA QUANTA Lite™ dsDNA Test für den Nachweis von ssDNA Autoantikörper in humanem Serum bestimmt und unterstützt die Diagnose des Systemischen Lupus erythematoses (SLE) und einiger anderer rheumatischer Erkrankungen. Der Test ist für sich allein nicht aussagekräftig, ist aber ein Parameter unter vielen bei der Beurteilung von Erkrankung und Diagnosefindung.

Informationen zum Test

Antinukleäre Antikörper (ANAs) werden bei Kollagenosen gebildet, ihr Nachweis stellt eine sensitive Screening-Methode dar.¹ ANA-Nachweise eignen sich auch hervorragend als Screening-Methode für den SLE, da ein negatives Ergebnis einen aktiven SLE ausschließt.² Antikörper gegen dsDNA kommen fast ausschließlich bei Patienten mit SLE vor und werden als "Marker"-Antikörper für diese Krankheit angesehen. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen dsDNA spricht für einen SLE, während das Fehlen von dsDNA-Antikörpern nicht in allen Fällen als Kriterium zum Ausschluß eines SLE gewertet werden kann.²

Autoantikörper gegen ssDNA treten bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen und bei anderen Krankheiten auf.^{3,4} Höchste Inzidenz und Titer werden bei Patienten mit SLE gefunden.⁴ Bei SLE-Patienten mit ssDNA Autoantikörpern wurde beschrieben, daß der Titer zur Überwachung von Krankheitsverlauf und Therapieerfolg verwendet werden kann.^{5,6} Obwohl ssDNA Antikörper nicht spezifisch für SLE sind, findet man sie manchmal als einzigen serologisch positiven Parameter bei SLE-Patienten, die keinen signifikanten ANA-Titer aufweisen.⁷ Viele der Patienten mit hohen ssDNA-Titern haben photosensitive, kutane Erkrankungen. Annähernd 25% der diskoiden Lupuspatienten haben Anti-ssDNA-Antikörper und ein erhöhtes Risiko, systemische Symptome zu entwickeln.³ Es konnte bei schweren Fällen von diskoidem Lupus mit Glomerulonephritis gezeigt werden, daß nur Anti-ssDNA-Antikörper gebildet werden.³ Diese Studien zeigen auch, daß die Bestimmung von ssDNA-Antikörpern einen wichtigen Nachweis darstellt, der bei der Bewertung von diskoiden Lupuspatienten und bei Patienten mit Verdacht auf ANA-negativem SLE Hilfestellung bietet.³ Denaturiert man thermische ssDNA, so binden Anti-ssDNA-Antikörper an Purine, Pyrimidine und an das Zucker-Phosphatgerüst des DNA-Moleküls.^{1,4} Vom technischen Standpunkt aus ist es unmöglich, die wahre Konzentration der anti-ssDNA-Antikörper in einem einzigen Test zu messen (Purin- und Pyrimidinbasen bilden das einzige Antigen). Die ELISA-Technik, die bei diesem Test verwendet wird, ist objektiv und die Ergebnisse können in einem semi-quantitativen Modus ausgewertet werden. Die ELISA-Durchführung kann sowohl für große als auch für kleine Probenaufkommen im Profilformat zusammen mit anderen Tests (wie dsDNA, Histone und ENAs) zur Beurteilung von rheumatischen Erkrankungen verwendet werden.

Testprinzip

Affinitätschromatographisch gereinigte, hitzedenaturierte ssDNA aus Kalbsthymus wurde an die Kavitäten der Polystyrol-Mikrotiterplatte unter Wahrung der ursprünglichen Konfiguration gebunden. Vorverdünnte Kontrollen und verdünnte Patientenseren werden in verschiedene Kavitäten pipettiert. Die vorhandenen ssDNA Antikörper binden an das Antigen. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humanes IgG wird in die Kavitäten pipettiert und bindet während einer zweiten Inkubation an den Patienten-Antikörper. Nachdem in einem weiteren Waschschrift das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein Chromogen-Substrat zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die quantitative Auswertung erfolgt durch einen Vergleich der Extinktionswerte der Patienten mit dem Wert eines Kalibrators.

Inhalt der Testpackung

1. Mikrotiter-ELISA-Platte beschichtet mit hochgereinigtem ssDNA Antigen (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 ssDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
3. ssDNA ELISA Low Positive (Kalibrator), 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen ssDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
4. ssDNA ELISA High Positive (positive Kontrolle), 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit Antikörpern gegen ssDNA, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
5. HRP Probenverdünner, 1 Flasche – rosa gefärbt mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung, Tween 20, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 50 mL
6. HRP Waschkonzentrat, 1 Flasche mit 40fachem Konzentrat – rot gefärbt mit gepufferter Kochsalzlösung und Tween 20, 25 mL. Zur Verdünnung bitte das entsprechende Kapitel in der Anleitung beachten.
7. HRP IgG Konjugat, (Ziege), anti-humanes IgG, 1 Flasche – blau gefärbt mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 10 mL

8. TMB Chromogen, 1 Flasche mit Stabilisatoren, 10 mL
9. HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure, 1 Flasche – farblos, 10 mL

Hinweise

1. VORSICHT: Probenverdünner, Kontrollen und Konjugat enthalten 0,02% Chloramphenicol. Es ist im US-Bundesstaat Kalifornien und allgemein bekannt, daß dieser Stoff Krebs verursachen kann.
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.⁸
3. NaN₃ wird als Stabilisator verwendet. NaN₃ 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 Absorption 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. Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
3. Unvollständiges Waschen und ungenügendes Entfernen der Flüssigkeiten aus den ELISA Kavitäten führt zu einer schlechten Präzision und zu hohen Hintergrund-Extinktionen.
4. Die Adaptation dieses Testsystems auf automatische Probenverarbeitung und andere Instrumentierung, ganz oder teilweise, kann unterschiedliche Ergebnisse zur manuellen Durchführung ergeben. Es liegt in der Verantwortung eines jeden Labors, die automatische Bearbeitung so zu überprüfen, daß Testergebnisse innerhalb akzeptabler Bereiche erzielt werden.
5. Eine Reihe von Faktoren beeinflusst das Testergebnis. Hierzu zählen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Pipettierens, der Typ des verwendeten Photometers, die Temperatur der Reagenzien, die Umgebungs-Temperatur, die Gründlichkeit des Waschens und der Entfernung der Flüssigkeiten aus den Vertiefungen der ELISA-Streifen, und die Einhaltung der Inkubationszeiten. Es ist deshalb sehr wichtig, für gleichbleibende Bedingungen zu sorgen.
6. Die strikte Einhaltung der Testprozedur wird empfohlen. Jede Änderung im Protokoll erfolgt auf Risiko des Anwenders.
7. Das unvollständige Verschließen der Mikrotiterkavitäten und des Trockenmittels führt zu Antigenabbau und schlechter Präzision.
8. Eine unakzeptabel niedrige Absorption kann beobachtet werden, wenn eine Flasche HRP Konjugat bei **zwei-** oder mehrfachem Gebrauch über einen längeren Zeitraum benutzt wird. Daher ist es wichtig, die Hinweise zum Umgang mit dem HRP Konjugat genau zu beachten.
9. Chemische Kontamination des HRP Konjugates kann durch unzureichendes Reinigen oder Spülen der Ausrüstung oder der Instrumente verursacht werden. Rückstände gebräuchlicher Laborchemikalien wie z.B. Formalin, Bleichmittel, Ethanol oder Spülmittel führen zum Abbau des HRP Konjugates im Verlauf der Zeit. Das gründliche Spülen der gesamten Ausrüstung und Instrumentierung nach Verwendung chemischer Reinigungsmittel ist daher unbedingt erforderlich.

Lagerung

1. Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.
2. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen.
3. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C eine Woche stabil.

Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Werden Azide oder andere Stabilisatoren zu den Serumproben gegeben, können die Ergebnisse nachteilig beeinflusst werden. Mikrobiologisch kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden. Nach der Blutentnahme ist das Serum vom Blut zu trennen. Das NCCLS Dokument H18-A2 empfiehlt die folgenden Lagerungsbedingungen für Patientenproben: 1) Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. 2) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. 3) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen und vor der Testung gut geschüttelt werden.

Testdurchführung

In der Testpackung vorhandenes Material

- 1 ssDNA ELISA Mikrotiterplatte (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter
- 1 1,2 mL vorverdünnte ELISA Negative Kontrolle
- 1 1,2 mL vorverdünnte ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle
- 1 1,2 mL vorverdünnte ssDNA ELISA High Positive Kontrolle
- 1 50 mL HRP Probenverdünner
- 1 25 mL HRP Waschkonzentrat, 40faches Konzentrat
- 1 10 mL HRP IgG Konjugat (von der Ziege), anti-humanes IgG
- 1 10 mL TMB Chromogen
- 1 10 mL HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure

Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5, 100, 200-300 und 500 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen
- Distilliertes oder deionisiertes Wasser
- 1 L Gefäß für verdünntes HRP Waschkonzentrat
- Reader für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (und 620 nm für eine bichromatische Messung)

Methode

Testvorbereitung

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) und gründlich mischen.
2. Den gesamten Inhalt (25 mL) des Waschkonzentrats mit 975 mL Aqua dest. mischen (1:40 Verdünnung). Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8°C eine Woche stabil. Soll nicht die gesamte Mikrotiterplatte auf einmal verwendet werden, so können für einen Ansatz von 16 Kavitäten 2 mL Konzentrat mit 78 mL Aqua dest. gemischt werden.
3. Serumproben 1:101 verdünnen, indem 5 µL Serum mit 500 µL gebrauchsfertigem Probenverdünner gemischt werden. Verdünnte Proben sollen innerhalb von 8 Stunden getestet werden. Der ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle, die ssDNA ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle **nicht verdünnen**.
4. Jeder Test benötigt zwei Kavitäten für jede der drei Kontrollen sowie eine oder zwei Kavitäten für die Patientenprobe (Es wird empfohlen, alle Proben in Doppelbestimmung anzusetzen, bis die erforderliche Präzision und Reproduzierbarkeit erreicht sind).

Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.** Die entsprechende Anzahl Mikrotiterkavitäten abrechnen. Die Kavitäten im Rahmen befestigen. **Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
2. Je 100 µL der gebrauchsfertigen ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle, der ssDNA ELISA High Positive Kontrolle, der ELISA Negative Kontrolle und der **verdünnten** Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Streifen abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren. Die Inkubationszeit beginnt nach Zugabe der letzten Probe.
3. Waschen: Den Inhalt aller Kavitäten absaugen. Die Kavitäten vollständig (200-300 µL) mit **verdünntem** HRP Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch zweimal wiederholen (Insgesamt: drei Waschschriffe). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Die Waschschriffe sind in der selben Reihenfolge wie die Pipettierschriffe durchzuführen.
4. 100 µL des HRP IgG Konjugates in jede Kavität geben. Sterile Pipetten verwenden! Nur das benötigte Volumen an Konjugat aus der Flasche entnehmen. **UNBENUTZTES KONJUGAT NICHT IN DIE FLASCHE ZURÜCKPIPETTIEREN. KONTAMINATIONSGEFAHR!!** Abgedeckte Streifen bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren, wie in 2. beschrieben.
5. Waschen: Schritt Nr. 3 wiederholen.
6. 100 µL TMB Chromogen in jede Kavität geben. 30 Minuten **im Dunkeln** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 100 µL HRP Stopplösung in jede Kavität pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des TMB Chromogens einhalten. Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln.
8. Die optische Dichte (OD) jeder Kavität bei 450 nm innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen. Es wird eine bichromatische Messung mit 620 nm als Referenzwellenlänge empfohlen.

Qualitätskontrolle

1. Die ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle, die ssDNA ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden, um sicher-zustellen, daß alle Reagenzien und der Testansatz insgesamt ordnungsgemäß funktionieren.

2. Da die ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle, die ssDNA ELISA High Positive Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle vorverdünnt sind, entfällt der Verdünnungsschritt der Patientenproben für die Kontrollen.
3. Zusätzliche Kontrollen zur Qualitätssicherung können gemäß den Richtlinien nationaler oder internationaler Regulierungs- oder Akkreditierungsbehörden eingesetzt werden. Geeignete Kontrollen können aus Humanserum gewonnen und bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.
4. Um sicher zu sein, daß alle Patientenwerte korrekt sind, müssen die nachfolgenden Kriterien erfüllt werden (Würden ein oder mehrere Kriterien nicht erfüllt, so ist das Ergebnis als ungültig zu betrachten und der Testansatz ist zu wiederholen).
 - a. Die Absorption der vorverdünnten ssDNA ELISA High Positive Kontrolle muß größer sein als die Absorption der vorverdünnten ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle. Die Absorption der ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle wiederum muß größer sein als die der vorverdünnten ELISA Negative Kontrolle.
 - b. Die Absorption der vorverdünnten ssDNA ELISA High Positive Kontrolle muß größer als 1,0 sein, die Absorption der vorverdünnten Negative Kontrolle darf nicht größer als 0,2 sein.
 - c. Die Absorption der ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle muß mehr als doppelt so hoch sein wie die Absorption der ELISA Negative Kontrolle oder über 0,25 liegen.
 - d. Die ELISA Negative Kontrolle und ssDNA ELISA High Positive Kontrolle dienen der Sicherstellung der ordnungsgemäßen Funktionsweise des Testansatzes. Die ssDNA ELISA High Positive Kontrolle stellt die Präzision am Cut-off des Tests nicht sicher.
 - e. Der Anwender sollte unter anderem das NCCLS Dokument Nr. C24-A für zusätzliche Hinweise zur zeitgemäßen Qualitätskontrolle beachten.

Berechnung der Ergebnisse

Zunächst sind die Mittelwerte der OD für die Doppelbestimmungen zu berechnen. Alle weiteren Berechnungen werden dann mit den entsprechenden Mittelwerten durchgeführt. Die Reaktivität jeder Patientenprobe wird bestimmt durch die Division des Mittelwertes der Proben-OD durch den Mittelwert der Low Positiven Kontrolle und der Multiplikation dieses Ergebnisses mit dem chargenspezifischen Wert der ssDNA ELISA Low Positiven Kontrolle. Die chargenspezifischen Werte sind auf dem Fläschchenetikett aufgedruckt.

$$\text{Probenwert (Units)} = \frac{\text{OD der Probe}}{\text{ssDNA ELISA Low Positive Kontrolle OD Wert}} \times \text{ssDNA ELISA Low Positive Kontrollwert (Units)}$$

Die Reaktivität verhält sich zur Konzentration der vorhandenen Antikörper nicht linear. Zunahme und Abnahme der Antikörperkonzentrationen von Patienten werden durch einen entsprechenden Anstieg oder Abfall der Reaktivität angezeigt, diese Änderungen sind jedoch nicht proportional (d.h. eine Verdoppelung der Antikörperkonzentration führt nicht zu einer Verdoppelung der Reaktivität). Wird eine genauere Quantifizierung der Patientenantikörper gewünscht, sind serielle Verdünnungen der Probe durchzuführen und der Titer der zuletzt als positiv gemessen wurde, sollte als Patienten-Antikörpertiter bewertet werden.

Interpretation der Ergebnisse

Dieser ELISA-Test ist sehr sensitiv und in der Lage, sogar kleine Unterschiede in Patientenpopulationen zu messen. Die folgenden Werte dienen als Beispiel für die Interpretation der Testergebnisse. Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet. Die folgende Information dient als Beispiel zur Unterstützung der Interpretation von Ergebnissen.

Da sowohl ssDNA- als auch dsDNA-Autoantikörper mit dem ssDNA-Antigen dieses Kits reagieren können, sollten Patientenproben auch auf dsDNA-Reaktivität getestet und diese Ergebnisse (in WHO Units) bei der Bewertung der ssDNA-Resultate berücksichtigt werden. Durch die Kombination der Ergebnisse des INOVA QUANTA Lite™ dsDNA ELISA mit denen des INOVA QUANTA Lite™ ssDNA ELISA kann durch die Berechnung des Verhältnisses von ssDNA/dsDNA auf die Höhe von ssDNA-Antikörper geschlossen werden. Das Verhältnis $\leq 0,5$ bedeutet Fehlen von ssDNA-Antikörper, während das Verhältnis $> 0,5$ Vorhandensein indiziert.

HINWEIS: Nur wenn die Ergebnisse des ssDNA-Antikörpertests positiv sind und das Verhältnis von ssDNA zu dsDNA Units $> 0,5$ ist, sollten die Patientenserum als positiv bewertet werden.

- Beispiel 1: Test 1: dsDNA Antikörper-Konzentration: 120 WHO U/mL
 Test 2: ssDNA Antikörper-Konzentration: 160 U/mL
 ssDNA Antikörper-Verhältnis (ssDNA/dsDNA): $160/120 = 1,33 (+)$
 Interpretation: Patientenprobe ist positiv für ssDNA Antikörper
- Beispiel 2: Test 1: dsDNA Antikörper-Konzentration: 270 WHO U/mL
 Test 2: ssDNA Antikörper-Konzentration: 130 U/mL
 ssDNA Antikörper-Verhältnis (ssDNA/dsDNA): $130/270 = 0,48 (-)$
 Interpretation: Patientenprobe ist negativ für ssDNA Antikörper
- Beispiel 3: Test 1: dsDNA Antikörper-Konzentration: 80 WHO U/mL
 Antikörper Test 2: ssDNA Antikörper-Konzentration: 80 U/mL
 ssDNA Antikörper-Verhältnis (ssDNA/dsDNA): $80/80 = 1,0 (+)$
 Interpretation: Patientenprobe ist positiv für ssDNA

Ist das Ergebnis als positiv befundet, können die ssDNA Units mit den folgenden klinischen Kategorien verglichen werden.

Weniger als 68,6 U/mL	Negativ für ssDNA-Antikörper
68,6 - 229 U/mL	Schwach positiv für ssDNA-Antikörper
über 229 U/mL	Stark positiv für ssDNA-Antikörper

Die Bestimmung der ssDNA Aktivität in Proben mit hohen Werten kann schwierig sein (z.B. größer als 2,0) sowohl für ssDNA als auch für dsDNA. Wenn Proben stark positiv sind, ist das Antikörper-Verhältnis irreführend, weil der ELISA mit Patienten-Autoantikörper gesättigt ist. Es wird empfohlen, stark positive Patientenproben nochmals auf ssDNA und dsDNA zu testen, indem sie mit HRP Probenverdünner nochmals 1:4 und 1:20 verdünnt werden (z.B. 1:404 und 1:2020), um festzustellen, ob die ssDNA Aktivität höher ist als die dsDNA Aktivität. Die Berechnungen müssen mit der gleichen Verdünnung der Patientenprobe durchgeführt werden.

Grenzen des Verfahrens

1. Da man davon ausgeht, daß IgG-Antikörper eine höhere klinische Relevanz haben, wird in diesem Testsystem IgG-spezifisches Konjugat verwendet. Die nicht nachgewiesenen IgM ssDNA-Antikörper können jedoch mit IgG-Antikörper um verfügbare Bindungsstellen konkurrieren. Wird eine Interferenz von IgM-Antikörpern vermutet, sollten die Proben bei einer höheren Verdünnung nochmals getestet werden. Ein hoher Anstieg des Ergebnisses signalisiert die Präsenz von konkurrierenden IgM-Antikörpern. Der neue Wert spiegelt die Konzentration der gesuchten ssDNA IgG-Antikörper in der Patientenprobe wider.
2. Die Gegenwart von Immunkomplexen oder anderen Immunglobulin-Aggregaten im Patientenserum kann eine Erhöhung von nicht-spezifischen Bindungen und falsch-positive Ergebnisse hervorrufen.
3. Da sowohl ssDNA als auch bestimmte dsDNA Autoantikörper mit dem ssDNA-Antigen im Testkit reagieren, sollten die Patientenproben ebenfalls auf dsDNA-Reaktivität getestet und diese Ergebnisse bei der Bestimmung der ssDNA Werte berücksichtigt werden.
4. Eine Reihe von Faktoren beeinflusst das Testergebnis. Hierzu zählen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Pipettierens, das verwendete Photometer und die Einhaltung der Inkubationszeiten. Es ist deshalb sehr wichtig, für gleichbleibende Bedingungen zu sorgen.
5. Die Diagnose kann nicht allein auf Grundlage der ssDNA-Antikörper Ergebnisse erstellt werden. Diese Ergebnisse sind im Zusammenhang mit den Resultaten des QUANTA Lite™ dsDNA Antikörpertests zu interpretieren. Bitte keinen dsDNA ELISA Test eines anderen Herstellers verwenden, da die Kalibrierung des ssDNA Antikörpertests mit dem des dsDNA genau abgestimmt ist.
6. Ergebnisse dieses Testes müssen im Zusammenhang mit klinischen Ergebnissen und anderen serologischen Tests verwendet werden.
7. Die Leistungscharakteristika für andere Untersuchungsmaterialien als Serum wurden nicht bestimmt.

Erwartungswerte

Die Fähigkeit des QUANTA Lite™ ssDNA ELISA Antikörper gegen ssDNA zu erkennen, wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen ELISA Test evaluiert. Die Ergebnisse des ELISA Tests wurden nach Angaben des Herstellers ermittelt.

Normalbereich

117 Seren wurden zufällig ausgewählt und mit dem QUANTA Lite™ ssDNA ELISA ausgetestet. Von diesen Proben zeigten sieben ein positives Ergebnis (69 oder mehr Units) mit diesem ELISA. Fünf dieser 7 Proben waren auch mit einer kommerziellen Referenzmethode für anti-ssDNA-Antikörper positiv und wurden deshalb aus dem Pool für Normalpatienten eliminiert. Der Mittelwert betrug 27 Units mit einer Standardabweichung von 21 Units. Der Bereich der Population erstreckte sich von 12 bis 186 Units. Diese Ergebnisse indizieren einen Normalbereich, der mehr als zwei Standardabweichungen unter dem Grenzwert liegt.

Relative Sensitivität und Spezifität

32 ANA-positive Patientenseren wurden zufällig ausgewählt und mit dem QUANTA Lite™ ssDNA Test und einem anderen kommerziell erhältlichen Test (Referenzmethode) ausgetestet. Von den 32 getesteten Proben waren 18 positiv und 12 waren in beiden Methoden übereinstimmend negativ. Zwei Proben waren in der Referenzmethode positiv, hingegen bei INOVA negativ. Bei der Austestung mit einem anderen kommerziell erhältlichen Testkit waren diese beiden Proben jedoch ebenfalls negativ. Dazu folgende Übersicht.

		INOVA			
		+	-		
Referenzmethode	+	18	2	Relative Sensitivität	90%
				Relative Spezifität	100%
	-	0	12	Relative Übereinstimmung	94%

Um die Spezifität des ssDNA-ELISAs besser untersuchen zu können, wurden hochtitrige und monospezifische Autoantikörperkontrollen im QUANTA Lite™ ssDNA ausgetestet. Diese Kontrollen beinhalten die High Kontrollen der folgenden INOVA QUANTA Lite™ ELISA Test evaluiert : Sm, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1, Thyroid mikrosomal und Thyroglobulin, Histone und Mitochondrien M2. Alle genannten Kontrollen zeigten ein negatives Ergebnis im ssDNA-Test.

ssDNA Reaktivität bei verschiedenen Mischkollagenosen:

	Anzahl der Patienten	% Positiv
SLE	43	58
Sjögren's Syndrom	21	62
Sklerodermie	15	80
Polymyositis	6	17
Medikamenten-ind. Lupus	20	80
Rheumatoide Arthritis	11	45*

*2 von den 5 positiven Seren waren nur grenzwertig positiv (69 und 99 Units).

25 der SLE Patienten waren ssDNA positiv. Sechs dieser ssDNA positiven SLE Patienten waren grenzwertig positiv mit einer sensitiven dsDNA ELISA Methode (INOVA). 13 der Sjögren's Syndrom-Patienten waren ssDNA positiv. Alle 21 Patienten waren im ELISA (INOVA) für SS-A, SS-B oder SS-A und SS-B positiv, drei dieser Sjögren's-Patienten waren ssDNA positiv und absolut negativ bei einer sensitiven dsDNA ELISA Methode (INOVA). 12 der 15 Scl-70 positiven Sklerodermie-Patienten waren positiv und nur einer von 6 Polymyositis-Patienten war ssDNA positiv. Alle sechs Polymyositis-Patienten zeigten Autoantikörper gegen Jo-1 im ELISA (INOVA). Der eine ssDNA positive Polymyositis-Patient (112 Units) wies keine Autoantikörper gegen dsDNA im ELISA (INOVA) auf.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse der Präzision und Reproduzierbarkeit wurden ermittelt, indem eine negative, stark positive und schwach positive Probe sechsmal in vier verschiedenen Ansätzen verwendet wurden. Der Mittelwert der hoch-reaktiven Probe lag bei 814 Units, der mittelreaktiven Probe bei 300 Units und der negativen Probe bei 72 Units. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt:

	Negativ		Stark positiv		Schwach positiv	
	SD	VK	SD	VK	SD	VK
Gesamt	4,7	6,6%	36	4,5%	8,0	2,7%
Intraassay	4,7	6,5%	35	4,3%	6,8	2,7%
Interassay	4,6	6,3%	24	3,0%	8,7	2,9%

Referenzen

1. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens(ANA): Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology* **33**: 167-239, 1982.
2. Casalo SP, Friou GJ and Myers LL: Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **7**: 379-390, 1964.
3. Provost TT, Herrera-Esparza R and Diaz LA: Nucleoprotein autoantibodies in lupus erythematosus. *J. Invest. Dermatol.* **85**: 133-139, 1985.
4. Koffler D, et al: Occurrence of single-stranded DNA in serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J. Clin. Invest.* **52**: 196-204, 1973.
5. Land A: Evaluation of the simultaneous estimation of antidsDNA and antissDNA antibodies for clinical purposes. *Clin. Exp. Immunol.* **31**: 472-481, 1978.
6. Gripenberg M, et al: Assessment of class-specific antibodies against denatured DNA in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol.* **5**: 314, 1985.
7. Maddison PJ, Provost TT and Reichlin M: Serological findings in patients with "ANA" negative systemic lupus erythematosus. *Medicine(Baltimore)* **60**: 87-94, 1981.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers 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



Authorized Representative in the EU:

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

Technical Service
628525DEU

888-545-9495
June 2009
Revision 11