

کیت سنجش آنتی بادی IgG علیه dsDNA به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزای anti-dsDNA IgG پیشتاز طب، برای سنجش کمی و نیمه کمی حضور آنتی بادهای IgG علیه عامل DNA دو رشته ای در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. از این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیص در بیماران لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) همراه با سایر تظاهرات بالینی به کار می رود. محتوای این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد.

مقدمه:

لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) یک بیماری خود ایمن سیستمیک می باشد که با تولید اتوآنتی بادی ها و بروز طیف گسترده ای از تظاهرات بالینی شناخته می شود. حضور آنتی بادی ها علیه DNA دو رشته ای (dsDNA) معیاری برای تشخیص SLE محسوب می گردد. رویکرد عملی در غربالگری اولیه بیماران استفاده از روشی مانند ELISA است که هر دو نوع آنتی بادی های با افینیتی پایین و بالا ضد dsDNA را شناسایی می کند. یکی از مشکلات روش ELISA واکنش آنتی بادهای با DNA تک رشته ای (ssDNA) است. آنتی بادهای ضد ssDNA فقط DNA تک رشته ای را می شناسند. این نوع از آنتی بادی ها نه تنها در بیماران مبتلا به SLE بلکه در سایر بیماریهای یافت همبند مانند اسکروز سیستمیک و میوزیت هم مشاهده می شود. بنابر این، استفاده از dsDNA بسیار خالص و همچنین هضم ssDNA با استفاده از نوکلئاز S1 استراتیجهای اساسی در تولید ELISA با کیفیت مناسب هستند. بر مبنای استفاده از روش های مختلفه شیوع آنتی بادی علیه DNA دو رشته ای بین ۲۰ الی ۸۰ درصد بیماران SLE گزارش شده است. به علت فراوانی بالا، حساسیت مناسب (۵۷٪) و ویژگی بالا (۸۰-۷۰٪)، حضور این آنتی بادی ها می تواند به عنوان مارکر سرولوژی مهمی در تشخیص SLE محسوب گردد. همچنین پس از تشخیص قطعی SLE، سنجش دوره ای آنتی بادی علیه DNA دو رشته ای برای پایش دوره های بالینی بیماران ضروری می باشد زیرا افزایش تیتراژ آنتی بادی علیه DNA دو رشته ای می تواند پیش بینی کننده شعله ور شدن بیماری باشد. از طرفی حضور آنتی بادی علیه DNA دو رشته ای با نوع شدید بیماری همراه با درگیری کلیوی مرتبط می باشد و افزایش تیتراژ آنتی بادی ها ممکن است پیش بینی کننده عود بیماری باشد. آنتی بادی های علیه DNA دو رشته ای زیر کلاس های مختلفی دارند. اکثر آنتی بادی های پاتولوژیک در SLE از کلاس IgG می باشند. از این رو کیت الایزای Anti-dsDNA IgG پیشتاز طب، برای سنجش کمی و نیمه کمی حضور آنتی بادهای IgG علیه عامل DNA دو رشته ای می تواند به عنوان یک ابزار کمک تشخیص در بیماران SLE همراه با سایر تظاهرات بالینی به کار برده شود.

اساس آزمایش:

اساس آزمایش در این کیت روش الایزای غیر مستقیم (indirect) می باشد. در این کیت چاهکهای پلیت توسط dsDNA خالص پوشانده شده اند. برای کویتینگ از روش منحصر به فردی برای اتصال پایدار dsDNA به کف چاهک استفاده شده است تا از نتایج کاذب پرهیز شود. در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته میشوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای dsDNA این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. پس از شستشو با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم متصل شده، در صورت وجود آنتی بادهای ضد dsDNA از نوع IgG، آنتی بادی نشاندار شده نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

۱) یک عدد پلیت دارای ۹۶ عدد چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای dsDNA

۱

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول - آذر ۹۹



- ۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): دو ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها (آماده برای مصرف-آبی رنگ)
- ۳) سری استانداردها (Standard Set): شامل ۴ ویال ۱ میلی لیتری از استاندارد با غلظتهای ۰,۱۰۰, ۰,۴۰۰, ۰,۸۰۰ IU/ml از Anti-dsDNA کالیبره شده در مقابل استاندارد مرجع NIBSC: 15/174 سازمان بهداشت جهانی (آماده برای مصرف-سبز رنگ)
- ۴) محلول آنزیم کوئزوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده برای مصرف-قرمز رنگ)
- ۵) سرم کنترل بالا (High Control): یک ویال ۱ میلی لیتری حاوی محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰,۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی علیه dsDNA (آماده برای مصرف-بنفش رنگ). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است.
- ۶) سرم کنترل پایین (Low Control): یک ویال ۱ میلی لیتری حاوی محلول دارای بافر فسفات و ۰,۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی علیه dsDNA (آماده برای مصرف-زرد رنگ)
- ۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف-بی رنگ)
- ۸) محلول شستشو (Wash Buffer): یک ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول شستشوی غلیظ (10x) دارای محلول بافر فسفات و ۰,۰۵٪ توئین، جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید.
- ۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی اسیدکلریدریک ۱ نرمال
- ۱۰) یک عدد برچسب مخصوص پلیت
- ۱۱) دستورالعمل مصرف

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)
- ۲) سمپلهای دقیق و کالیبره ۱۰۰، ۱۰۰۰ و میکرولیتری و سر سمپلهای مخصوص یکبار مصرف
- ۳) لوله آزمایش برای رقیق سازی
- ۴) کاغذ نمگیر
- ۵) آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- ۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند.
- ۲) تمامی محتویات کیت تنها برای استفاده تشخیصی در آزمایشگاه می باشند.
- ۳) تنها پرسنل آموزش دیده بایستی از این تست استفاده نمایند.
- ۴) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری آنتی بادی های ضد dsDNA در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است.
- ۵) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید.
- ۶) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادهای HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار میکنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

۷) نمونه بیماران، استانداردها، کنترلها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

شرایط نگهداری:

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید.
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد.
- ۴) ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید. قبل از تهیه محلول شستشوی کار، برای حل شدن کریستالها، ویال را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (درضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

آماده سازی اولیه نمونه ها:

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه). توجه: کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند. پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهک های مورد نیاز را بردارید.
- ۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند. از خشک شدن چاهک ها در بین مراحل انکوباسیون پرهیز شود.
- ۳) حتما از نوک سمپلر یکبار مصرف برای هر نمونه استفاده شود.
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند.
- ۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می باشد. بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود.

مراحل انجام آزمایش:

- تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم های کنترل و نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهکها بریزید.
برای سنجش کمی، اولین چاهک برای بلانک، چهار چاهک بعدی برای استانداردهای مختلف، دو چاهک بعدی به ترتیب برای سرم کنترل پایین و بالا و سایر چاهکها را برای نمونه ها استفاده کنید، پیشنهاد می گردد استانداردها و نمونه ها به صورت دوپلیکیت استفاده شود و در انتها میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده گردد.
برای سنجش نیمه کمی، اولین چاهک برای بلانک، چاهک بعدی برای استاندارد (استاندارد 100 IU/ml)، دو چاهک بعدی به ترتیب برای سرم کنترل پایین و بالا و سایر چاهکها را برای نمونه ها استفاده کنید. پس از پوشاندن درب چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهکها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو، چاهکها را درحالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.
- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) آماده مصرف را به داخل چاهکها بریزید. پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۳).
- ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید. چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید.
- با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.

ارزشیابی آزمایش:

- این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد:
- در روش کمی جذب نوری استاندارد صفر و ۸۰۰ IU/ml به ترتیب کمتر از ۰/۱ و بیشتر از ۱/۲ و برای روش نیمه کمی جذب نوری استاندارد ۱۰۰ بیشتر از ۰/۱ قابل قبول است.
 - جذب نوری بلانک کمتر از ۰/۱ قابل پذیرش است.

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود.

نتایج نیمه کمی:

- جذب نوری استانداردها، کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید.
- نتایج با محاسبه نسبت میانگین جذب نوری نمونه یا کنترل به جذب نوری استاندارد شماره ۲ (۱۰۰ IU/ml) محاسبه می گردد. فرمول زیر برای محاسبه نسبت استفاده می گردد:

$$\text{جذب نوری کنترل یا نمونه بیمار} = \frac{\text{جذب نوری استاندارد شماره 2}}{\text{ایندکس}}$$

تفسیر نتایج به صورت زیر صورت می گیرد:

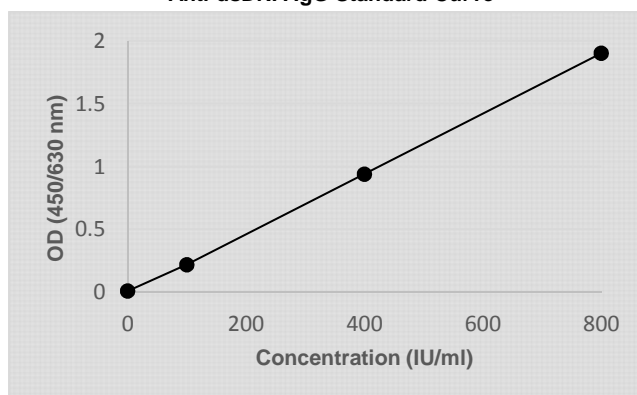
ایندکس < 1.0	منفی
ایندکس 1.0	مثبت

نتایج کمی:

- (۱) جذب نوری استانداردها، کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزایدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید .
- (۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
- (۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

استانداردها (IU/ml)	جذب نوری (450/630 nm)
0	0.01
100	0.22
400	0.94
800	1.9

Anti-dsDNA IgG Standard Curve



توجه: جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر قابل انتظار در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

<100 IU/ml	منفی
≥100 IU/ml	مثبت

شاخصهای اجرایی:

(۱) مطالعه مقایسه ایی :

کیت سنجش آنتی بادی IgG علیه dsDNA شرکت پیشداز طب با نمونه سرم های تایید شده با دو کیت تجاری مربوطه مقایسه شدند. نمونه های مثبت از جمعیت بیماران مراجعه کننده به یکی از مراکز ریفرال درمان بیماران روماتولوژیک انتخاب شدند. نتایج در جداول مربوطه آمده است.

تعداد نمونه مقایسه ایی (۴۵۱)	کیت رقابتی الایزای سنجش anti-dsDNA IgG			
		+	-	جمع
کیت سنجش آنتی بادی IgG علیه dsDNA پیشداز طب زمان	+	136	5	141
	-	12	298	310
جمع		148	303	451

نتایج تست های مقایسه ایی بروی نمونه های ذکر شده بیانگر حساسیت: ۹۱/۹٪، اختصاصیت: ۹۸/۳۵٪ و صحت: ۹۶/۲٪ برای کیت شرکت پیشداز طب است.

(۲) حداقل مقدار قابل اندازه گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) مرز شاهد (LoB) در این کیت 7.6 IU/ml می باشد. بر اساس جذب نوری نمونه با غلظت پایین آنالیت و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت قابل تشخیص آنتی بادی IgG علیه dsDNA در این کیت 30 IU/ml می باشد.

(۳) دقت آزمایش:

جهت بررسی تکرارپذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله سه نمونه سرمی با غلظت های متفاوت آنتی بادی IgG علیه dsDNA انجام شد که نتایج آن در جداول مربوطه آمده است.

جدول ۱- آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

CV %	SD (IU/ml)	میانگین (IU/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	نمونه
9.40	5.03	53.49	20	نمونه 1
1.90	7.23	379.57	20	نمونه 2
2.53	15.51	613.61	20	نمونه 3

جدول ۲- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

CV %	SD (IU/ml)	میانگین (IU/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	نمونه
10.30	6.48	62.94	20	نمونه 1
7.61	24.5	321.82	20	نمونه 2
5.60	35.74	640.65	20	نمونه 3

۴) ریکاوری آزمایش:

سه نمونه سرم با مقادیر معلوم از آنتی بادی IgG علیه dsDNA به ۳ سرم با غلظتهای مشخص آنتی بادی IgG علیه dsDNA افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است:

* جهت تست ریکاوری از استاندارد های کیت استفاده نشود .

جدول ۳- ریکاوری:

ریکاوری (%)	مقدار بدست آمده (IU/ml)	مقدار مورد انتظار (IU/ml)	مقدار Anti-dsDNA IgG افزوده شده (IU/ml)	مقدار anti-dsDNA IgG موجود در سرم (IU/ml)	نمونه
96.4	80.73	83.73	128.21	39.25	۱
119.4	601.7	503.75	705.68	301.82	2
108.1	424.35	392.47	106.48	678.46	3

۵) خطی بودن آزمایش:

به کمک محلول رقیق کننده نمونه رفتهای متوالی ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از anti-dsDNA IgG تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت و درصد ریکاوری محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است.

ریکاوری (%)			مقدار anti-dsDNA IgG موجود در سرم رقیق نشده (IU/ml)	نمونه
رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
115.5	117.5	108.0	708.38	۱
115.4	116.9	112.5	755.9	۲
93.9	94.9	100.5	577.79	۳

۶) واکنش متقاطع:

واکنش متقاطعی سرمی با سرم های مثبت از نظر آنتی بادی های علیه اسکلوودرما (تعداد= ۲۰) و ارتريت روماتوئید (تعداد= ۱۲) مشاهده نشد.

References:

- Isenberg D. Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus? *Lupus*. 2004;13(11):881-5.
- Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86.
- Zigon P, Lakota K, Cucnik S, et al. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patients' and blood donors' sera. *Croat Med J*. 2011;52(6):694-702.
- Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(10):565-579.
- Bragazzi NL, Watad A, Damiani G, Adawi M, Amital H, Shoenfeld Y. Role of anti-DNA auto-antibodies as biomarkers of response to treatment in systemic lupus erythematosus patients: hopes and hopes. Insights and implications from a comprehensive review of the literature. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(11):969-978.
- Wichainun R, Kasitanon N, Wangkaew S, et al. Sensitivity and specificity of ANA and anti-dsDNA in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: a comparison using control sera obtained from healthy individuals and patients with multiple medical problems. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2013;31(4):292-8.
- Conti F, Ceccarelli F, Perricone C, et al. Systemic Lupus Erythematosus with and without Anti-dsDNA Antibodies: Analysis from a Large Monocentric Cohort. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:328078.
- Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis*. 2014;2014:321359.
- Rekvig OP. The dsDNA, Anti-dsDNA Antibody, and Lupus Nephritis: What We Agree on, What Must Be Done, and What the Best Strategy Forward Could Be. *Front Immunol*. 2019;10:1104.
- Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001;44(10):2342-9.
- Villalta D, Bizzaro N, Bassi N, et al. Anti-dsDNA antibody isotypes in systemic lupus erythematosus: IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease. *PLoS One*. 2013;12(8):e71458.

روش انجام آزمایش آنتی بادی IgG علیه dsDNA به صورت شماتیک
نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید .

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن های اختصاصی dsDNA			
محلولها	استانداردها	کنترل ها	نمونه
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	-	-
کنترل ها	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه آماده شده	-	-	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بیوشانید و آن را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید.			
آنزیم کونژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بیوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار دهید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			