



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

Gebrauchsinformation

**BIOGNOST® nDNS ANTIKÖRPER NACHWEIS**

INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZTEST zum Nachweis von ANTIKÖRPERN gegen NATIVE DNS (nDNS) auf CRITHIDIA LUCILIAE in humanem Serum

Testkit für 60 Bestimmungen, Best.Nr. 6060

Alle Reagenzien des Testkits sind auch einzeln erhältlich

Testdauer: ca. 90 min

Beim **nDNS Ak** Nachweis werden die Seren zum Screenen 1:2 oder 1:5, zum Titrieren gemäß 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 etc. oder 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 etc. mit PBS Puffer verdünnt.\*)

\*) sofern die regionalen Referenzbereiche mit den von Bios® bestimmten Werten übereinstimmen (siehe Abschnitt Interpretation der Ergebnisse)

**BESTIMMUNGSGEMÄßER GEBRAUCH**

Der Biognost® nDNS Ak Nachweis ist ein indirekter Immunfluoreszenztest für die qualitative und/oder semi-quantitative Bestimmung von Autoantikörpern gegen native DNS in humanem Serum. Der Biognost® nDNS IFT ist zum Einsatz in der Diagnostik des Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) bestimmt.

**EINFÜHRUNG**

Gegen den Zellkern und seine Bestandteile gerichtete Autoantikörper (antinukleäre Antikörper - ANA) werden bei Autoimmun-erkrankungen oft nachgewiesen. Einige dieser Antikörper sind krankheitsspezifisch und daher als diagnostische Marker geeignet, andere treten bei verschiedenen Erkrankungen auf. Im Serum von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) findet man häufig ein breites Spektrum von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene, z.B. Histone, Einzelstrang-DNS (ssDNS), native DNS (nDNS), Nukleoproteine (Sm, SS-A, SS-B, RNP ect.). Diese Antikörper sind jedoch mit Ausnahme von anti-nDNS und anti-Sm nicht spezifisch für den SLE und treten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen häufig auf. Dagegen sind besonders die Antikörper gegen native, doppelsträngige DNS (nDNS, dsDNS) für den Systemischen Lupus Erythematosus charakteristisch. Die Antikörper lassen sich bei 40-70% aller SLE Patienten nachweisen, während der aktiven Phasen der Erkrankung bei über 90% der Fälle. Die höchsten Titer findet man bei Patienten mit schwerer Nierenbeteiligung. In den aktiven Phasen des SLE sowie bei Nierenbeteiligung und in der Remission dominieren Antikörper der IgG Klasse, während bei asymptomatischem Verlauf oft IgM und IgG in gleich hohen Titern nachgewiesen werden.

Es besteht eine Korrelation zwischen den Titern und der Intensität der Erkrankung. Bei Remission und Therapie mit Immunsuppressiva fallen die Titer, teilweise auch bis unter die Nachweisgrenze. Ein Ansteigen des Titers kündigt dagegen einen neuen Krankheitsschub an. Bei Gesunden findet man keine Antikörper gegen nDNS. Der Nachweis von Antikörpern gegen doppelsträngige DNS ist daher eines der Kriterien der American Rheumatism Association (ARA) zur Diagnose des SLE. Antikörper gegen Doppelstrang-DNS reagieren mit dem Desoxyribose-Phosphat-Gerüst der DNS, Antikörper gegen Einzelstrang-DNS dagegen mit den Basen oder Basensequenzen, welche beim Doppelstrang im Inneren der Helix verborgen sind. Antikörper gegen Einzelstrang-DNS treten bei vielen Krankheitsbildern und bei Gesunden auf. Die spezifische Erfassung der Antikörper gegen Doppelstrang-DNS ist deshalb von wesentlicher Bedeutung.

Bei Methoden, die mit aufgereinigter nDNS als Substrat arbeiten, kann es durch Abbaureaktionen (Strangbrüchen) zu Verunreinigungen mit ssDNS kommen, wodurch die diagnostische Spezifität herabgesetzt wird. Als optimales Substrat werden daher beim indirekten Immunfluoreszenztest mit Crithidia luciliae ganze Zellen eingesetzt. Crithidia luciliae, ein für den Menschen nicht pathogener Hämoflagellat, besitzt ein intrazelluläres Organell, den Kinetoplasten, welcher dichtgepackt native DNS in großen Mengen enthält. Die Kinetoplasten enthalten keine Histone oder andere ANA Antigene, Antikörper gegen ssDNS sowie gegen andere Kernantigene reagieren nicht mit dem Kinetoplasten.

Neben dem hier beschriebenen Biognost® nDNS IFT sind für die ANA Diagnostik im Bios® Produktprogramm folgende Testsysteme enthalten: als Screening Test Biognost® ANA IFT auf HEP-2 Zellen (Best.Nr. AN-1060 und AN-1120) und als Differenzierungstest der Biognost® ENA RID (radialer Doppelimmundiffusionstest nach Ouchterlony) zum Nachweis von Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene.

**TESTPRINZIP**

Der Test basiert auf der klassischen Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Die Substratobjektträger sind mit Antigen beschichtet. Im ersten Schritt wird Patientenserum auf den Objektträger aufgebracht und inkubiert. Falls im Serum Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen vorhanden sind, werden diese gebunden. Unspezifische Antikörper, sonstige Proteine usw. werden durch einen Waschschriff entfernt. Um eine Beschädigung oder das Ablösen des Antigens zu vermeiden, darf während des Waschens nicht gerührt werden. Nach Auftragen des entsprechenden FITC markierten Antihumanimmunglobulins (Konjugat) und erneuter Inkubation im zweiten Schritt wird nochmals gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Der Komplex Antigen / humane Antikörper / Konjugat ist dann unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-500facher Vergrößerung sichtbar.

Beim Nachweis von IgM und/oder IgA Antikörpern wird ein Trennsystem zur Absorption von IgG und Rheumafaktoren (Biosorb®) dem ersten Schritt vorgeschaltet (siehe Punkte INHALT und UNTERSUCHUNGSMATERIAL).

Enthält das zu untersuchende Serum keine Antikörper gegen das entsprechende Antigen, so unterbleibt die Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe. Unter dem Mikroskop sind dann auch keine spezifischen Fluoreszenzmuster beobachtbar.

**GRENZEN DER METHODE**

Die Nachweise mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik weisen qualitativ die jeweiligen Antikörper nach. Der individuelle Antikörpertiter eines Patienten kann nicht als Maß für die Schwere der Erkrankung gesehen werden, da Antikörper von verschiedenen Patienten unterschiedliche Affinitäten aufweisen können. Deshalb ist eine absolute Standardisierung der Ergebnisse schwierig. Andererseits ist dieser Nachteil nämlich die (theoretisch) optimale Breite des Antigenangebots, der größte Vorteil dieser Methode. Indirekte Immunfluoreszenztests sind gute Screening Tests.

Durch den Einsatz positiver Kontrollen, bei denen die Titer angegeben sind, ist eine semiquantitative Aussage möglich.

Das Testergebnis sollte nicht als alleinige Basis zur Beurteilung des klinischen Bildes verwendet werden, er sollte immer im Gesamtzusammenhang (klinische Symptomatik, Zeitpunkt der Probenahme, andere Laborwerte, Hersteller und eigener Referenzbereich etc.) und in Kombination mit anderen verfügbaren Patientendaten gesehen werden.

**INHALT DES TESTKITS UND SONSTIGER TESTREAGENZIEN****1. TESTKIT**

Best.Nr. 6060: Biognost® nDNS IFT; 60 Bestimmungen: 10 Objektträger mit 6 Auftragstellen; 0,3 ml positive Kontrolle; 0,5 ml Autoantikörper negative Kontrolle; 2 ml polyspezifisches Konjugat; 1,5 ml Einschlussmedium; 2x 10 g PBS Puffer Festsubstanz; 15 Deckgläser; Gebrauchsinformation.

**Bitte beachten:** Der aufgeführte Kit ist nicht immer verfügbar.

**2. EINZELREAGENZIEN****2a. Objektträger:**

Best.Nr. 6006 Biognost® nDNS Objektträger; beschichtet mit Crithidia luciliae (ATCC 11745); 6 Auftragstellen.

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® and Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

**2b. Positive Kontrolle:**

Best.Nr. 6202: Biognost® nDNS positive Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält Antikörper gegen native DNS, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,3 ml.

**2c. Negative Kontrolle** - verwendbar für alle Biognost® autoimmunologischen Immunfluoreszenztests:

Best.Nr. 1111A: Biognost® Autoantikörper negative Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält keine mit der Immunfluoreszenztechnik nachweisbaren Autoantikörper (IgG, IgM, IgA), gebrauchsfertig; 0,5 ml.

**2d. Konjugate** - verwendbar für alle Biognost® autoimmunologischen Immunfluoreszenztests auf Gewebeschnitten und Zellen:

Best.Nr. 1500; Best.Nr. 15300 bzw. Best.Nr. 151000: Biognost® polyspezifisches Konjugat; Antihumanimmunglobulin für Rattengewebe, Crithidia luciliae und HEp-2 Zellen, FITC markiert, gebrauchsfertig; 2 ml; 3 ml bzw. 10 ml

Best.Nr. 1500G; Best.Nr. 15300G bzw. Best.Nr. 151000G: Biognost® IgG Konjugat; Antihumanimmunglobulin G für Rattengewebe, Crithidia luciliae und HEp-2 Zellen, FITC markiert, gebrauchsfertig; 2 ml, 3 ml bzw. 10 ml.

**2e. Sonstige Reagenzien** - verwendbar für alle Biognost® Immunfluoreszenztests:

Best.Nr. 1605 bzw. Best.Nr. 1606: Biognost® Phosphatpuffer; 4x 5 g bzw. 2x 10 g leicht lösliche PBS Puffer Festsubstanz zur Herstellung von jeweils 500 ml bzw. 1000 ml Pufferlösung; enthält 10 mM NaPhosphat, und 150 mM NaChlorid, pH 7,5.

Best.Nr. 1610 bzw. Best.Nr. 161010: Biognost® Einschlussmedium pH 7,5; gebrauchsfertig; 1,5 ml bzw. 10 ml.

Best.Nr. 1706 bzw. Best.Nr. 17606: Biognost® Saugpapierschablonen für Objektträger mit 6 Auftragsstellen; 10 Stück bzw. 60 Stück.

Best.Nr. 1700 bzw. Best.Nr. 17200: Biognost® Deckgläser; 15 Stück bzw. 200 Stück.

**2f. IgG/IgM (IgG/IgA) Trennsysteme:**

Best.Nr. 90-1048 bzw. Best.Nr. 90-1120: Biosorb®; IgM (IgA) Isolierung mittels anti-human IgG Antiserum; IgM (IgA) Endverdünnung 1:5; 2 ml für ca. 48 Patientenproben (Trennungen) bzw. 5 ml für ca. 120 Patientenproben (Trennungen); Gebrauchsinformation Best.Nr. S0001tid.

**ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN**

Reaktionsgefäße zur Herstellung der Verdünnungsreihen

Pipetten (Bereich 1-1000 µl)

Vortex Mischer

Messkolben (500 ml bzw. 1000 ml) zur Herstellung des Phosphatpuffers

Destilliertes oder demineralisiertes Wasser

Feuchte Kammer

Färbetröge (möglichst groß)

Spritzflasche für PBS Puffer

Kurzzeitmesser

Dunkelfeld Fluoreszenzmikroskop mit trockenem Objektiv (ohne Immersionsöl zu benutzen) mit Filtern, für eine Anregungswellenlänge von 450-490 nm und eine Emission von 560-590 nm. Für eine höhere Empfindlichkeit ist ein Auflichtmikroskop einem Durchlichtmikroskop vorzuziehen.

**LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Objektträger, Kontrollen, Konjugate und Biosorb® müssen bei der jeweils auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Die Objektträger sind weiterhin wegen der Austrocknungs- und Denaturierungsgefahr im geschlossenen Aluminiumbeutel luftdicht verschweißt zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Reagenzien **ungeöffnet** bis zum Verfallsdatum haltbar. Nach Ablauf des Verfallsdatums sind sie nicht mehr zu verwenden.

Nach Anbruch müssen die Reagenzien wieder gut verschlossen und bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Sie sind dann schnellstmöglich zu verbrauchen. Der Verfall einer Charge definiert nicht die Haltbarkeit bei Wiederverwendung.

Die PBS Puffer Festsubstanz ist bei Raumtemperatur und darunter **ungeöffnet**, d.h. im Aluminiumbeutel luftdicht verschweißt, unbegrenzt haltbar.

Einschlussmedium, Saugpapierschablonen und Deckgläser sind bei Raumtemperaturlagerung oder niedrigerer Temperatur ebenfalls unbegrenzt haltbar. Das Verfallsdatum auf dem Etikett dient beim PBS Puffer, Einschlussmedium sowie bei den Saugpapierschablonen und Deckgläsern der Organisation der Lagerhaltung. Angesetzte PBS Pufferlösung (pH 7,5) ist am selben Tag zu verbrauchen, da sie kein Konservierungsmittel enthält. Bei Verwendung am nächsten Tag muss sie zwischenzeitlich bei 5-10°C verschlossen gelagert werden. PBS Pufferlösungen mit Schlieren-, Flocken- oder Trübungsbildung bzw. Farb- oder pH-Wert-Änderung sind zu verwerfen.

**SICHERHEITSHINWEISE**

1. Alle im Punkt INHALT aufgeführten Kits und Reagenzien sind ausschließlich für die in vitro Diagnostik bestimmt.

2. Alle humanen Seren, die zur Herstellung der im Punkt INHALT aufgeführten Zubereitungen aus humanen Seren (Kontrollen) verwendet wurden, wurden auf HBsAg und Antikörper gegen HIV untersucht und für negativ befunden. Da trotzdem die Infektiosität nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, sollten sie mit der entsprechenden Vorsicht verwendet werden.

3. Kontrollen, Konjugate und Einschlussmedium enthalten 0,09% Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Das Verschlucken und Haut- bzw. Schleimhautkontakt ist zu vermeiden. Natriumazidhaltige Reagenzien dürfen nicht mit kupfer- oder bleihaltigen Gegenständen in Verbindung gebracht werden (Bildung explosiver Salze).

4. Einige Konjugate enthalten Evans blue (auf dem Etikett angegeben). Evans blue könnte karzinogen sein (der Schweizer Giftklasse 1\* zugeordnet). Vermeiden Sie deshalb das Verschlucken sowie den Hautkontakt mit Evans blue haltigen Lösungen.

5. Sicherheitsbestimmungen der Berufsgenossenschaft und des jeweiligen Institutes (Labors) bezüglich biogefährdenden, giftigen und reizenden Stoffen sind strikt zu beachten (siehe Aushänge, Laborjournal, Sicherheitsbelehrung sowie die aus Zertifizierung bzw. Akkreditierung resultierenden Arbeitsvorschriften).

6. Die aktuellen Regeln der guten Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP) sollten immer beachtet werden.

7. Nach der Testdurchführung sind alle im Test benutzten Reagenzien und Seren entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen.

**UNTERSUCHUNGSMATERIAL**

Als Untersuchungsmaterial kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Bei 5-10°C ist Serum/Plasma ca. 1 Woche haltbar. Für eine längere Lagerung und Mehrfachnutzung sollten Seren/Plasmen in kleinere Portionen (> 50 µl) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei ≤-20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von größeren Mengen an Seren/Plasmen kann zur Bildung von Proteinaggregaten sowie zum Abbau von Serum/Plasmabestandteilen führen und ist deshalb zu vermeiden. Wenn Azid bei den durchzuführenden Untersuchungen nicht stört (wie zum Beispiel leider bei Peroxidase ELISAs) wird Serum/Plasma auch durch Zugabe von 0,09% Azid für längere Zeit (≥ 1 Jahr) im Kühlschrank in der Regel ohne Analytverlust lagerfähig. Beim IgM bzw. IgA Nachweis wird eine Vorbehandlung des Patientenserums notwendig, um Störeffekte durch Rheumafaktoren, welche das Vorhandensein von IgM vortauschen können, und IgG Antikörper, welche die IgM/IgA Bindung kompetitiv hemmen können, zu vermeiden. Die Trennung der Antikörperklassen kann mit dem von Bios® erhältlichen gebrauchsfertigen Trennsystem Biosorb® durchgeführt werden (siehe Trennsysteme). Obwohl für die IgG/IgM Trennung optimiert, kann Biosorb® auch zur Probenvorbehandlung bei IgA Bestimmungen verwendet werden. IgG Antikörper werden aus der Probe entfernt, während IgM und der größte Teil der IgA Antikörper in der Probe verbleiben. Durch die Vorbehandlung werden die Proben verdünnt. Der Verdünnungsfaktor von 1:5 ist bei der Herstellung der Testverdünnungen für den IgM bzw. IgA Nachweis zu berücksichtigen. Die Trennung sollte unmittelbar vor dem Testansatz erfolgen.

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® an Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

## QUALITÄTSKONTROLLE UND FEHLERSUCHE

Eine positive Kontrolle für jeden zu interpretierenden Parameter und eine negative Kontrolle sollten bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Ergeben die Kontrollen nicht die auf dem Etikett angegebenen Ergebnisse, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Kann der auf dem Etikett der positiven Kontrolle angegebene Titer ( $\pm 1$  bis 2 Verdünnungsstufen) im Anwenderlabor nicht reproduziert werden, so sollte überprüft werden, ob ausschließlich Biognost® Testreagenzien im Testansatz verwendet wurden oder z.B. andere Deckgläser, anderes Einschlussmedium, nicht frisch angesetzter Biognost® Puffer. Weiterhin muss überprüft werden, ob das benutzte Fluoreszenzmikroskop einwandfrei funktioniert; mögliche Fehlerquellen sind ölverschmutzte Objektive, Dejustierung oder eine zu schwache Lampe. Desweiteren ist zu prüfen, ob die Reagenzien richtig gelagert wurden bzw. bereits verfallen sind, ob die im Testansatz verwendete feuchte Kammer feucht genug ist, ob der Objektträger mit einem Filzstift beschriftet wurde (bitte nur harten Bleistift benutzen) etc. Auch sollten die Reagenzien auf keinen Fall durch Erhitzen auf Raumtemperatur gebracht werden.

Konjugate können durch die Pufferleerwertkontrolle auf eventuelle unspezifische Anfärbung des Substrates überprüft werden: Analog den Kontrollen oder den vorverdünnnten Patientenseren wird auf eine Auftragstelle die entsprechende Menge PBS Pufferlösung aufgetragen und der üblichen Testdurchführung unterworfen. Die Sensitivität und Spezifität dieses Tests unterliegt einer ständigen Überwachung durch das Bios® Kontrolllabor. Bios® setzt alle verfügbaren WHO oder anderweitig definierten Kontroll- bzw. Serumstandards zur Teststandardisierung ein.

Die Biognost® positiven und negativen Kontrollen sind anhand der verfügbaren Standards oder Seren von klinisch charakterisierten Patienten bzw. Blutspendern kalibriert.

Eine Gewährleistung durch die Firma Bios® ist nur dann gegeben, wenn die Angaben der Gebrauchsinformation exakt eingehalten, im Test nachweislich nur Bios Produkte eingesetzt werden und der Test nur durch Fachpersonal durchgeführt wird.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Die Biognost® Objektträger, Kontrollen und das Konjugat sind gebrauchsfertig, sobald sie sich auf Raumtemperatur erwärmt haben (ca. 5 min). Die Kontrollen und das Konjugat sind also unverdünnt zu benutzen.

Hinweise für die Benutzung von Biosorb® als IgG/IgM (IgG/IgA) Trennsystem sind im Punkt INHALT und in der Gebrauchsinformation Best.Nr. S0001tid zu finden.

Die Biognost® Kontrollen sind soweit notwendig vortrennt. Sie sollen weder einer Trennung in Bezug auf Immunglobulinklassen noch gegebenenfalls einer Absorption unterzogen werden.

Die Biognost® Objektträger sind gebrauchsfertig fixiert. Die Substrate können bei einem weiteren Fixierschritt zerstört werden.

Vor Beginn des Testansatzes sind die Seren entsprechend den Vorgaben (Screeninguntersuchung, Titration) mit PBS Pufferlösung oder einer Lösung aus PBS mit 1% Rinderserumalbumin zu verdünnen.

Das Pipettierschema des Tagesansatzes muss vor Beginn des Testansatzes schriftlich in einem dafür vorgesehenen Formular festgelegt werden. Dieses Formular ist die Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse und deren Dokumentation.

1. Objektträger vorsichtig aus der Alu-Verpackung nehmen (Einkerbung zum Aufreißen ist vorgestanz!), ohne die Auftragstellen zu berühren. Zum Beschriften der Objektträger nur harten Bleistift, niemals Filzstift verwenden.

2. Kontrollen und vorverdünnnte Patientenseren auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle ca. 15-50  $\mu$ l).

3. Objektträger 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.

4. Objektträger feuchter Kammer entnehmen, Serum- bzw. Flüssigkeitsüberschuss mit PBS vorsichtig abspülen (Strahl aus Spritzflasche dabei keinesfalls direkt auf die Auftragstelle richten!).

5. 2x 5 min in PBS Puffer waschen (nach 1x 5 min Wechsel in neuen Puffer); möglichst große Färbetröge benutzen, und den (die) Objektträger im PBS Puffer nicht bewegen bzw. nicht rühren.

6. Objektträger mit Saugpapierschablonen trocknen, aber Substrat dabei nicht trocken werden lassen und deshalb sofort anschließend

7. das entsprechende Konjugat auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle ca. 15-50  $\mu$ l). Ein Tropfen aus Biognost® Konjugatflaschen entspricht ca. 25  $\mu$ l.

8. Objektträger lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei speziell vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.

9. Schritte 4-6 wiederholen. Objektträger nicht mit destilliertem Wasser spülen, sondern sofort

10. 2-3 kleine Tropfen Einschlussmedium auf dem Objektträger verteilen, Präparat luftblasenfrei mit Deckglas versehen und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Bei dunkler und kühler Aufbewahrung kann innerhalb der folgenden 24 Stunden ausgewertet werden. Nicht eingedeckte Präparate müssen sofort mikroskopiert werden. Übergelaufenes Einschlussmedium vorsichtig mit einem mit PBS angefeuchteten Papiertuch entfernen, um ein Ankleben am Mikroskopoptisch bzw. im Präparatebehältnis zu vermeiden. Langzeitkonservierung der Präparate: Versiegeln der Kanten mit etwas farblosem Nagellack, Lagerung bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  bis zu mehreren Jahren.

Dieser Test ist für den automatisierten (gerätegestützten) Testansatz nicht ausgetestet.

## BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Die Präparate werden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-500fachen Vergrößerung beurteilt (Filterbereich 450-490 nm). Nicht zu lange ein und dasselbe Gesichtsfeld mustern, sondern in rascher Folge möglichst viele Gesichtsfelder auswerten, um das Ausbleichen des Präparats zu vermeiden.

Ein Testansatz kann nur dann bewertet werden, wenn die mitgeführten Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigen.

### Fluoreszenzmuster:

Zur Auswertung muss die Anfärbung des Kinetoplasten, der meist zwischen dem Zellkern und dem Geisselansatz liegt und meistens etwas kleiner als der Zellkern ist, beurteilt werden.

### Positiv:

Die spezifische Fluoreszenz ist eine helle apfelgrüne Farbe mit unterschiedlicher Intensität: von 1+ schwach; über 2+ mäßig; 3+ stark bis 4+ brilliant.

### Negativ:

Fluoreszenzen mit geringerer Intensität als 1+ werden als negativ beurteilt. Gelbliche oder dunkelgrüne Fluoreszenzen sind unspezifisch und dürfen nicht berücksichtigt werden.

### Titer:

Der Titer ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, bei der noch mindestens eine 1+ Fluoreszenz zu sehen ist.

Beispiel: Wird die 1:80 Verdünnung mit 1+ positiv bewertet, die 1:160 Verdünnung aber negativ, so ist der Titer 80.

### Zielantigen oder Zielstruktur:

Eine Probe wird als nDNS positiv beurteilt, wenn mindestens eine 1+ Fluoreszenz des Kinetoplasten zu sehen ist. Häufig fluoreszieren bei positiven Proben Kinetoplast und Zellkern. Ein negatives Testergebnis liegt vor, wenn die Kinetoplastenfluoreszenz fehlt. Alleinige Fluoreszenzen des Zellkerns und/oder des Basalkörperchens (Geisselansatz) werden ebenso wie eine allgemeine Anfärbung des ganzen Organismus als negativ bewertet. Einziges Kriterium für die Entscheidung positiv/negativ ist die Fluoreszenz des Kinetoplasten.

### Interpretation der Ergebnisse:

#### 1. Referenzbereich und Spezifität:

Referenzbereiche können bei der Befundinterpretation eine Orientierungshilfe darstellen. Referenzbereiche geben an, welche Messwerte (Titer, Extinktion) bei gesunden Normalpersonen zu erwarten sind. Referenzbereiche sind eine statistische Größe und können in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs (Alter, Geschlecht, Geographie) sowie in Abhängigkeit von der jeweiligen Messmethode differieren. Zwischen Kranken und Gesunden besteht

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® an Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

messtechnisch generell keine scharfe Grenze, vielmehr ist der Übergang meist fließend.

Definitionsgemäß umfasst der Referenzbereich nur 95% des gemessenen Konzentrationsbereichs. 5% der gesunden Personen des untersuchten Kollektivs liegen demnach außerhalb des Referenzbereiches ohne krank zu sein.

Ein innerhalb des Referenzbereiches liegendes Laborergebnis schließt daher eine Krankheit nicht sicher aus. Ein außerhalb liegendes Ergebnis ist für sich alleine kein zwingender Beweis für eine Krankheit.

Untersuchung von gesunden Blutspendern:

Basierend auf der Auswertung von gesunden Blutspendern im Alter zwischen 22 und 40 Jahren aus allen Teilen Deutschlands sowie dem angrenzenden Ausland (Österreich, Schweiz, Luxemburg, Frankreich, Holland) wurden für den Biognost® nDNS IFT folgende Referenzbereiche ermittelt.

#### anti-nDNS

Anzahl der Blutspender: 335

Referenzbereich (Titerbereich): <2 - 2

Messwerte oberhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 1

Mittlerer Durchsuchungstiter: 1

Serumverdünnung für Screening (Vorschlag): 1:2 oder 1:5

#### Spezifität:

Nach der Ermittlung des Referenzbereiches kann die diagnostische Spezifität des Assays daraus abgeleitet werden.

Die Spezifität eines Tests gibt an, wie viel Prozent der Gesunden ein „normales“ Testergebnis haben („richtig negativ“). Die Anzahl aller Gesunden entspricht der Summe aus „richtig negativ“ und „falsch positiv“.

Die diagnostische Spezifität wird gemäß folgender Formel definiert:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig Negative}}{\text{Anzahl richtig Negative} + \text{Falsch Positive}} \times 100 \%$$

Für den Biognost® nDNS IFT ergibt sich eine Spezifität von 100%.

#### 2. Sensitivität:

Untersuchung von erkrankten Personen:

Die Sensitivität eines Tests gibt an, wieviel Prozent der Kranken ein pathologisches Testergebnis haben („richtig positiv“). Die Anzahl aller Erkrankten entspricht der Summe aus „richtig positiv“ und „falsch negativ“.

#### anti-nDNS

Anzahl der Patienten: 15

Messergebnisse (Titer): 40 - 1280

Messwerte unterhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 0

Die diagnostische Sensitivität wird gemäß folgender Formel definiert:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig Positive}}{\text{Anzahl richtig Positive} + \text{Falsch Negative}} \times 100 \%$$

Beim Biognost® nDNS IFT ergibt sich eine Sensitivität von 100%.

Beim Biognost® nDNS IFT kann bei Vorliegen entsprechender Symptome jede spezifische Fluoreszenz auf eine Erkrankung hindeuten. Gegebenenfalls sollte das Serum auch noch unverdünnt untersucht werden.

Obige Werte sollten in den einzelnen Labors kritisch überprüft werden. Jedes Labor sollte eigene Grenztiter unter Einbeziehung der regionalen Besonderheiten definieren. Vor allem bei Kindern, Senioren und immungeschwächten Patienten sollte mit niedrigeren Grenztitern gearbeitet werden.

Statistische Auswertungen können bei Fallzahlen unter 10 000 ungenau sein.

Auch von anderen Autoren wurde ermittelt, dass Seren von normalen Kontrollgruppen auch unverdünnt keine Fluoreszenz des Kinetoplasten zeigen, deshalb kann bereits das Auftreten von anti-nDNS in der unverdünnten Probe diagnostische Bedeutung haben. Bei einer aktiven Erkrankung (aktive SLE bzw. Lupus nephritis) werden im allgemeinen Titer > 40 nachgewiesen. Bei Patienten mit inaktivem Lupus bzw. nach immunsuppressiver Behandlung werden meistens niedrige Titer (< 40) oder auch negative Ergebnisse gefunden.

#### LITERATUR

1. Tan E.M., Chan E.K.L., Sullivan K.F., Rubin R.L.: Antinuclear Antibodies (ANAs): Diagnostically Specific Immune Markers and Clues Toward the Understanding of Systemic Autoimmunity. Clin. Immunol. Immunopath. 47, 1988, 121-141.
2. Stollar B.D.: Anti-DNA Antibodies. Clin. Immunol. Allergy 1, 1981, 243-260.
3. Sontheimer R.D., Gilliam J.N.: An Immunofluorescence Assay for Double Stranded DNA Antibodies Using the Crithidia Luciliae Kinetoplast as a Double Stranded DNA Substrate. J. Lab. Clin. Med. 91, 1978, 550-558.
4. Stingl G., Meingassner J.G., Swelty P., Knapp W.: An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin. Immunol. Immunopath. 6, 1976, 131-140.
5. Slater N.G.P., Cameron J.S., Lessof M.A.: The Crithidia luciliae Kinetoplast Immunofluorescence Test in Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 25, 1976, 480-486.
6. Chubick A., Sontheimer R.D., Gilliam J.N., Ziff M.: An Appraisal of Tests for Native DNA Antibodies in Connective Tissue Diseases - Clinical Usefulness of Crithidia luciliae Assay. Ann. Int. Med. 89, 1978, 186-192.
7. Whiteside T.L., Dixon J.A.: Clinical Usefulness of The Crithidia luciliae Test For Antibodies To Native DNA. Am. J. Clin. Pathol. 72, 1979, 829-835.
8. Whitehouse J.J., Fehr K., Wagenhaeuser F.J.: Systemic Lupus Erythematosus and the Crithidia Luciliae Immunofluorescent Test. A Comparative Study with an Adapted Farr Radioimmunoassay. Z. Rheumatol. 42, 1983, 28-35.
9. Sarvas H., Gripenberg M., Leirisalo-Repo M.: Anti-DNA Antibodies: The Choice of Assays for Routine Diagnostic Work. Acta Path. Immunol. Scand. Sect.C 93, 1985, 13-18.
10. Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F., Masi A.T., McShane D.J., Rothfield N.F., Schaller J.G., Talal N., Winchester R.J.: The 1982 Revised Criteria For The Classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthr. Rheum. 25, 1982, 1271-1277.
11. Aarden L.A., De Groot E.R., Feltkamp T.E.W.: Immunology of DNA. III. Crithidia Luciliae: A Simple Substrate For the Detection of Anti-dsDNA With The Immunofluorescence Technique. Ann. NY Acad. Sci. 254, 1975, 505-515.
12. Weller T.H., Coons A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varizella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 1954, 789-794.
13. Riggs J.L., Siewald R.J., Burckhalter J.H., Downs C.M., Metcalf T.G.: Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum. Am. J. Pathol. 34, 1958, 1081-1097.
14. Thomas, Lothar: Labor und Diagnose, 5. Auflage 1998, 1495.

**Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® an f Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany**

**Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.**

**Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.**

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com