



ANTI-nDNA ANTIBODIES (nDNA)

BioSystems

CODE 44825 24 Bestimmungen	CODE 44818 60 Bestimmungen	CODE 44817 120 Bestimmungen
CODE 44820 10 x 6 Bestimmungen		CODE 44819 10 x 12 Bestimmungen
BEI 2-8 °C AUFBEWAHREN		
Reagenzien zur qualitativen Antikörperbestimmung von Anti-nDNA <i>In-vitro</i> -Diagnostikum für das klinische Labor		

ANTI-nDNA-ANTIKÖRPER (nDNA)

Indirekte Immunfluoreszenz
CRITHIDIA LUCILIAE

METHODENPRINZIP

Anti-nDNA-Antikörper im Serum binden an das entsprechende Antigen in *Crithidia luciliae*. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Fluorescein-markierten Antikörpern gegen humanes Immunglobulin nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.¹

INHALT

	CODE 44825	CODE 44818	CODE 44817
A. Objektträger	4 x 6 Bestimmungen	10 x 6 Bestimmungen	10 x 12 Bestimmungen
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. nDNA-Kontrolle positiv	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	2 x 0.3 mL
C-. Kontrolle negativ	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	2 x 0.3 mL
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 mL	1 x 3 mL	2 x 3 mL
E. Eindeckmedium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Blotting-Papier	1 x 10	1 x 10	1 x 10

	CODE 44820	CODE 44819
A. Objektträger	10 x 6 Bestimmungen	10 x 12 Bestimmungen

ZUSAMMENSETZUNG

- A. Objektträger:** *Crithidia luciliae*, fixiert in jedem Feld.
- B. PBS (10x):** Natriumphosphat, Kaliumphosphat, Natriumchlorid, Natriumazid 0.95 g/L, pH-Wert 7,2.
- C+. nDNA-Kontrolle positiv:** Humanserum mit anti-Native-DNA Antikörper (nDNA), Natriumazid 0.95 g/L.
- C-. Kontrolle negativ:** Humanserum, Natriumazid 0.95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans:** Gegen humanes IgG gerichtete Antikörper (Ziege), konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Evans-Blau, Natriumazid 0.95 g/L.
- E. Eindeckmedium:** Mowiol, glycerol, Tris, sodium azide 0.95 g/L.
- F. Blotting-Papier.**

Die für die Herstellung der Kontrollen positiv und negativ verwendeten Humansen wurden getestet und in Bezug auf die Anwesenheit von Anti-HIV- und Anti-HCV-Antikörpern sowie von HBs-Antigen für negativ befunden. Dennoch sollten die Kontrollen mit Vorsicht und als potentiell infektiös behandelt werden.

LAGERUNG

Bei 2-8°C aufbewahren.

Die Reagenzien bleiben bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, sofern sie fest verschlossen gelagert werden und eine Kontamination während ihrer Anwendung vermieden wird.

Anzeichen für Verfall:

- Flüssige Bestandteile: Vorhandensein von Partikeln, Trübung.
- Objektträger: Eingerissene Folienpackung, makroskopisch sichtbare Defekte am Zellpräparat, wie Kratzer oder eine sich ablösende Zellschicht.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN

- B. PBS (10x).**
- D. IgG FITC/Evans**-markiert, Gegenfärbung mit Evans-Blau.
- E. Mounting Medium.** Eindeckmedium.
- C+. nDNA-Kontrolle positiv.**
- C-. Kontrolle negativ.**

REAGENZIENVORBEREITUNG

PBS: Stellen Sie eine Verdünnung der Reagenz B 1/10 mit destilliertem Wasser her. Haltbar 1 Monat bei 2-8 °C, wenn es gut verschlossen bei der empfohlenen Temperatur gelagert wird und wenn darauf geachtet wird, dass es bei der Verwendung nicht kontaminiert wird.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE AUSRÜSTUNG

- Feuchte Kammer
- Waschküvette
- Deckgläser 24 x 60 mm
- Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 495 nm und einem Emissionsfilter von 525 nm zum Sichtbarmachen der FITC-Markierung.

PROBEN

Mit gebräuchlichen Verfahren gewonnenes Serum oder Plasma. Bei 2-8°C bleibt es eine Woche stabil.

Verdünnen Sie die Proben vor dem Test im Verhältnis von 1:10 mit PBS (siehe Reagenzienvorbereitung).

Zur Titration positiver Proben verdünnen Sie diese in einer Verdünnungsreihe jeweils zweifach, beginnend mit einem Verhältnis von 1:10 mit PBS.

VERFAHREN

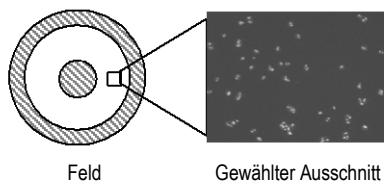
1. Bringen Sie die Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur.
2. Geben Sie auf jedes Feld des Objektträgers (A) einen Tropfen (25 µL) der verdünnten Probe oder der Kontrolle. Achten Sie darauf, dass das Feld vollständig bedeckt ist (Anmerkung 1).
3. Inkubieren Sie den Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) in der feuchten Kammer.



4. Zum Entfernen von Probentropfen klopfen Sie vorsichtig gegen den geeigneten Objektträger. Vermeiden Sie dabei eine Kreuzkontamination der Seren.
5. Spülen Sie den Objektträger vorsichtig mit PBS (siehe Reagenzienvorbereitung) ab (Anmerkung 2).
6. Waschen Sie den Objektträger 5 Minuten lang gründlich in einer mit PBS gefüllten Waschküvette. Wechseln Sie das PBS und wiederholen Sie das Waschen.
7. Tupfen Sie die Objektträger zum Entfernen der Flüssigkeit vorsichtig mit dem mitgelieferten Blotting-Papier ab. Die Zellpräparate müssen jedoch während des Verfahrens feucht gehalten werden.
8. Geben Sie auf jedes Feld einen Tropfen Reagenz D. Inkubieren Sie den Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) in der feuchten Kammer.
9. Wiederholen Sie die Schritte Waschen (6) und Abtupfen (7).
10. Geben Sie auf jedes Feld einige Tropfen Reagenz E und decken Sie den Objektträger mit einem Deckglas ab, ohne dabei Luftblasen einzuschließen.

AUSWERTUNG

Werten Sie den Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) aus. Die besten Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Auswertung der Objektträger sofort erfolgt. Wählen Sie, wie in der Abbildung angegeben, einen Ausschnitt mit gleichmäßiger Zellverteilung, der sich zwischen dem zentralen Bereich und dem Randbereich befindet, da die Fluoreszenzintensität in der Mitte und am Rand für die Präparation nicht repräsentativ ist.



Crithidia luciliae ist ein Hämoflagellat, der ein als Kinetoplast bezeichnetes modifiziertes Mitochondrium mit Doppelstang-DNA (nDNA) enthält, nicht mit Histonen assoziiert ist und offenbar kein weiteres Kernantigen aufweist. Der Kinetoplast ist eine runde Organelle, die kleiner als der Zellkern ist und sich zwischen diesem und dem Basalkörper befindet (2,3,4).

Zeigen die Kinetoplasten in der empfohlenen Verdünnung eine spezifische Fluoreszenzfärbung, gilt dies als positives Ergebnis. Der Zellkern, der Basalkörper oder das Flagellum können zwar ebenfalls eine Fluoreszenzfärbung aufweisen, aber nur die Fluoreszenz des Kinetoplasten ist zu berücksichtigen.

Positive Seren können ausstitriert werden. Der Serumtiter ist definiert als die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch ein positives Ergebnis festgestellt wird.

QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Überprüfung der Assay-Leistung sollte die in den Testkits Code 44825, Code 44817 und Code 44818 enthaltene Kontrolle positiv (C+) und Kontrolle negativ (C-) zusammen mit den Patientenproben getestet werden.

Die Kontrolle positiv (C+) sollte die oben beschriebene spezifische Färbung ergeben.

Die Kontrolle negativ (C-) darf keine spezifische Färbung ergeben.

Jedes Labor sollte ein internes Protokoll für die Qualitätskontrolle sowie Maßnahmen zur Fehlerbehebung für den Fall festlegen, dass die Kontrollergebnisse nicht innerhalb der zulässigen Toleranzgrenzen liegen.

TESTEIGENSCHAFTEN

IgG-FITC/Evans ist in Bezug auf dem internationalen Standard der WGO für FITC-markierte Human-IgG vom Schaf geeignet.

Wahrhaftigkeit: Die mit diesem Reagenz ermittelten Ergebnisse zeigten keine systematische Abweichung gegenüber Referenzreagenzien. Ausführliche Angaben zu den Vergleichsstudien sind auf Anfrage erhältlich.

DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

Der *Crithidia luciliae*-Immunfluoreszenztest auf Anti-nDNA-Antikörper besitzt für systemischen lupus erythematoses (SLE) zwar eine hohe diagnostische Spezifität, aber nur eine mäßige diagnostische Sensitivität. Anti-nDNA-Antikörper zählen zu den am häufigsten nachgewiesenen Autoantikörpern, die mit SLE assoziiert sind: Sie kommen bei 95% der SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung, bei 50 – 70% der SLE-Patienten ohne Nierenbeteiligung und bei 40% der Patienten mit inaktivem SLE vor. Bei Gesunden werden sie hingegen kaum gefunden.⁽⁵⁾

Der Testkit Anti-nDNA-Antikörper von BioSystems wurde mit 80 Seren von SLE-Patienten und gesunden Spendern überprüft. Die Ergebnisse sind im folgenden beschrieben.

	N	Pos.	Neg.	Sens.	Spez.
SLE: (systemischer Lupus erythematoses)	4	29	14	67%	100%
<i>SLE ohne Nierenbeteiligung</i>	2	15	10	60%	100%
<i>SLE mit Nierenbeteiligung</i>	1	14	4	78%	100%
Andere Autoimmunkrankheiten	2	0	20		
Kontrollen Gesunder	1	0	17		

Die klinische Diagnose sollte nicht nur anhand eines einzigen Testergebnisses, sondern der Gesamtheit der klinischen Befunde und Laborergebnisse gestellt werden.

ANMERKUNGEN

1. Vermeiden Sie es, die auf den Feldern fixierten Zellen während der Durchführung des Verfahrens zu berühren.
2. Um beim Waschen der Objektträger eine Kreuzkontamination zwischen benachbarten Proben zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung einer Spritzflasche oder Pipette.

LITERATUR

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Hrsg. Howard GC. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Aarden LA, de Groot ER und Feltkamp TEW. Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 1975; 254: 505-515.
3. Stingl G et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin Immunol and Immunopathol 1976; 6: 131-140.
4. Konstantinov KN und Russanova VR. Evidence for absence of histones in the *Crithidia luciliae* kinetoplast: a study with anti-H2A and monoclonal anti-H3 antibodies. British Journal of Dermatology 1987; 117: 451-456.
5. Conrad K, Schöller W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A Diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. Pabst Science Publishers, 2002