



## **COLORZYME<sup>®</sup> nDNA-TESTSYSTEM**

**Nur zur *in vitro*-Diagnostik**  
**Für Professionellen Gebrauch**

**INDIKATION:** Dies ist ein indirekter Enzym-Antikörpertest für den semiquantitativen Nachweis von anti-nDNA Antikörpern in humanem Serum. Der Test dient als Hilfestellung bei der Diagnose von systemischem Lupus erythematoses.

### **ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS**

Der Terminus antinukleäre Antikörper (ANA) ist ein Oberbegriff zur Beschreibung von Autoantikörpern gegen verschiedene Zellkernproteine. Frühere Studien dieser Autoantikörper, die mit Immunofluoreszenztechniken arbeiteten, haben einige wenige Spezifitäten von Zellkernproteinen aufgezeigt (1). Wegen der hohen Korrelation positiver ANA mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) ist diese Erkrankung bei negativen ANA grundsätzlich auszuschließen (2).

Auch wenn DNA-spezifische Antikörper weiterhin eine hohe Korrelation mit SLE (3) aufweisen, wurde in den letzten 10 Jahren eine Reihe nukleärer (4) und zytoplasmischer (5-7) Makromoleküle nachgewiesen und mit anderen Bindegewebserkrankungen in Verbindung gebracht (8-10). Einige dieser Antikörper haben offenbar einen diagnostischen und/oder prognostischen Wert bei systemischer Sklerose (11, 12), gemischter Bindegewebskrankheit (13-15), Sjögren-Syndrom (16, 17), Polymyositis (18) und rheumatoider Arthritis (19). Aus diesem Grunde werden ANA Tests mittlerweile als allgemeine Screening-Methode zum Nachweis von Bindegewebskrankheit anerkannt (20).

Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) können Antikörper gegen eine ganze Reihe nukleärer Antigene produzieren. Die gegen Sm (Smith-Antigen) und nDNA gerichteten Antikörper zeigen jedoch die höchste Korrelation mit der Krankheit (20). Gegen Sm gerichtete Antikörper weisen eine gefleckte ANA-Färbung auf, gegen nDNA gerichtete Antikörper erzeugen indessen eine homogene ANA-Färbung. Auch wenn im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom, progressiver systemischer Sklerose, Dermatomyositis, diskoidem Lupus erythematosus und gemischter Bindegewebskrankheit (21) niedrige Spiegel von nDNA-Antikörpern vorhanden sind, so treten hohe Spiegel von nDNA-Antikörpern dagegen fast ausschließlich bei SLE auf. Man geht davon aus, dass Antikörper gegen nDNA an der Pathogenese der meisten schweren Varianten von SLE beteiligt sind, wenn sie als Immunkomplex abgelagert werden (22). Antikörper gegen nDNA treten bei hohen Titrierungen auf, und da sie mit der Krankheitsaktivität korrelieren (23), ist ihr Nachweis für die Behandlung von SLE-Patienten von Bedeutung.

Die indirekte Immunofluoreszenz hat sich, auf Grund der kleinen Größe des *Crithidia luciliae* Organismus, für einige Labors als problematisch erwiesen. Es sollten deshalb hochwertige optische Geräte und eine ebensolche Fluoreszenz-Ausrüstung verwendet werden. Aus diesem Grunde und wegen der Notwendigkeit, die für die Fluoreszenz-Mikroskopie typischen Probleme mit der laborübergreifenden Reproduzierbarkeit zu reduzieren, wurde das Colorzyme<sup>®</sup> nDNA Testsystem von Immuno Concepts entwickelt. Serum-Antikörper mit Reaktivität auf nDNA werden durch Verfärbung des Kinetoplast im Organismus *Crithidia luciliae* nachgewiesen (24). *C. luciliae* ist ein für Menschen apathogener Parasit der Schmeißfliege. Der Kinetoplast dieser Hämoflagellaten ist Teil des großen Mitochondriums, in dem die helixförmige nDNA konzentriert ist (24-25). Im Elektronenmikroskop erscheint der Kinetoplast als leicht konkave, scheibenförmige Struktur, die mitochondriale Cristae und fibröse DNA-Masse enthält (26). Der Kinetoplast liegt zwischen dem zentralen Nukleus und dem Basalkörper des Flagellum. Da die nDNA des Kinetoplast keine Kontamination durch einsträngige DNA (ssDNA) aufweist, werden mögliche Probleme mit falsch-positiven Reaktionen auf ssDNA, die bei einem Radioimmuntest mit Kalbsthymus-DNA auftreten können, so gut wie eliminiert (25, 27-31).

# TESTPRINZIP

Der Colorzyme® nDNA Test von Immuno Concepts arbeitet mit der Technik der indirekten Enzym-Antikörper. Dabei werden Patientenproben mit Antigensubstrat inkubiert, um spezifische Bindungen von Autoantikörpern an Kinetoplast-nDNA zu ermöglichen. Wenn nDNA-Antikörper vorhanden sind, bildet sich ein stabiler Antigen-Antikörperkomplex. Nach dem Waschen, bei dem nicht-spezifische Antikörper entfernt werden, wird das Substrat mit einem anti-Human-Antikörperreagens, das an Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, inkubiert. Bei positivem Ergebnis bildet sich ein stabiler dreiteiliger Komplex, bestehend aus an humane anti-nDNA-Antikörper gebundenen enzymmarkierten Antikörpern, welche ihrerseits an nDNA-Antigen gebunden sind. Dieser Komplex kann durch Inkubation des Objektträgers in Farbreagens, das ein enzymespezifisches Substrat enthält, sichtbar gemacht werden. Die Reaktion zwischen enzymmarkiertem Antikörper und enzymespezifischem Substrat führt zu einer Verfärbung auf dem Objektträger, die unter einem gewöhnlichen Lichtmikroskop sichtbar ist. In positiven Proben weist der Kinetoplast eine dunkelblau bis purpurne Verfärbung im Organismus von *Crithidia luciliae* auf. Wenn die Probe für nDNA-Antikörper negativ ist, zeigt der Kinetoplast keinerlei Verfärbung.

## SYSTEMKOMPONENTEN - IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

**Verwendung:** Sämtliche Komponenten werden gebrauchsfertig geliefert, ohne dass Aliquotieren oder eine Rekonstitution erforderlich sind (mit Ausnahme von PBS-Puffer und Colorzyme® Farbreagens, die vor Gebrauch in deionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden müssen).

**Aufbewahrung:** Alle Komponenten können gekühlt bei 2-10°C aufbewahrt werden. Nach Rekonstitution sollte PBS-Puffer in Behälter mit Schraubverschluss gespeichert und zwischen 2-25°C gelagert werden. Nach Rekonstitution kann Colorzyme® Farbreagens im geschlossenen Behälter bei Zimmertemperatur bis zu 30 Tage lang aufbewahrt werden. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbreagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

**Stabilität:** Alle Komponenten sind bis mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum stabil. Keine Komponenten nach Überschreiten des Verfallsdatums verwenden.

### REAKTIVE REAGENZIEN

**Substratträger [SLIDE]:** Objektträger für nDNA-Substrat mit direkt in den Testvertiefungen stabilisierter *Crithidia luciliae*. Durch eine spezielle Konstruktion wird die Gefahr der Kreuzkontamination der Vertiefungen bei den Tests minimiert. Der Objektträgerbeutel ist mit einem inaktiven nicht-toxischen Gas gefüllt, das zur Stabilität der Zellen beiträgt.

**Positivkontrolle [CONTROL] +:** Katalognummer 3021. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum mit nDNA-Antigen-spezifischen Antikörpern. Dieses Serum erzeugt eine helle positive Verfärbungsreaktion des Kinetoplast, oder von Kinetoplast und Nukleus, auf dem *Crithidia luciliae*-Substrat von Immuno Concepts.

**Titrierbares Kontrollserum [TC]:** Katalognummer 3026. Gebrauchsfertiges Fläschchen mit 0,5 ml positivem Human-Kontrollserum zur unverdünnten Verwendung als Patientenprobe. Siehe Etikett für Titrierungswert.

**Negativkontrollserum [CONTROL] -:** Katalognummer 3031. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml negativem Human-Kontrollserum. Das Negativkontrollserum erzeugt keinerlei spezifische Verfärbung des Kinetoplast auf dem *Crithidia luciliae*-Substrat von Immuno Concepts.

**Enzym-Antikörperreagens [CONJ|HRP]:** Katalognummer 5009 (9,0 ml), 5075 (23,0 ml). Anti-human-IgG, an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens in Präzisions-Tropffläschchen mit 9,0 ml für alle 10 Objektträger im Lieferumfang des Testkits.

**Farbreagens [PWDR|CRP]:** Katalognummer 4066. HRP-spezifisches Enzym-Substratpulver, enthält 4-Chloro-1-Naphthol. Jede Packung enthält Pulver für 150 ml selbstaktivierendes Colorzyme® Farbreagens.

**Herstellung:** Inhalt eines Beutels mit 150 ml deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Gut durchmischen, bis das Pulver völlig aufgelöst ist. Dieses Farbreagens ist 30 Tage stabil, wenn es bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Behälter aufbewahrt wird. Dieses Farbreagens kann bis zu 30 Tage lang, oder bis eine Farbänderung oder Ausfällung zu beobachten ist, wiederverwendet werden. Trübungen oder Schimmern bei Wiederverwendung, ohne sichtbare Ausfällungen, sind normal. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbreagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

## NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

**PBS-Waschpuffer** **PWDR|PBS**: Katalognummer 1011. Phosphat-gepuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für 1 Liter gebrauchsfertigen Puffer. (Ein Beutel Pufferpulver für je fünf Objektträger ist im Lieferumfang des Testkits enthalten).

**Herstellung:** Einen Beutel Pufferpulver in 1 Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen und speichern Sie zwischen 2-25°C bis zu 4 Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind.

**Semipermanentes Eindeckmedium** **SOLN|MM**: Katalognummer 1111. Gebrauchsfertiges Tropf-Fläschchen mit 5,0 ml Glycerol-basiertem Montagemedium.

**Deckgläser** **CVSLP**: Katalognummer 1042. Jede Packung enthält zehn Deckgläser 24 x 64 mm Nr. 1.

## ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Präzisionspipetten für Volumina von 20-25 µl  
Drei Coplin-Glaszylinder oder Färbungsschalen  
Spritzflasche oder Pasteur-Pipetten  
Serologische Pipetten  
Mehrere 1-Liter-Behälter mit Schraubverschluss (für PBS-Waschpuffer)  
Geschlossener Behälter zur Aufbewahrung von Colorzyme® Farbreagens  
Deionisiertes oder destilliertes Wasser  
Teströhrchen zur Herstellung von Reihenverdünnungen  
Saugpapier oder Papierhandtücher  
Inkubationskammer  
Einmalhandschuhe  
Laborstoppuhr  
Standard-Lichtmikroskop mit 200- und 400-facher Vergrößerung

## SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche zur Herstellung von Kontrollseren für dieses Produkt verwendeten Materialien humanen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) getestet. Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kontrollseren wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen in: Centers for Disease Control / National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Der Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Falls hämolysierte oder lipämische Seren verwendet werden müssen, die Seren durch Hitzeinwirkung (30 Minuten bei 56°C) inaktivieren, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Mikrobiell kontaminierte Seren dürfen nicht verwendet werden.
7. Das titrierbare Kontrollserum ist für die Überwachung der Chargen- und Testlauf-übergreifenden Reproduzierbarkeit bestimmt. Es ist nicht zur Messung der Gesamtsensibilität oder Spezifität des Tests bestimmt.
8. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
9. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
10. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
11. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.
12. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.

13. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Objektträger und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
14. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
16. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.
17. Dieses Farbreagens kann bis zu 30 Tage lang, oder bis eine Farbänderung oder Ausfällung zu beobachten ist, wiederverwendet werden. Trübungen oder Schimmern bei Wiederverwendung, ohne sichtbare Ausfällungen, sind normal. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbreagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

## PROBENGEWINNUNG

**Probenentnahme:** Nach Möglichkeit sollten Serumproben hergestellt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem aseptisch ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Zimmertemperatur (18-25°C) gerinnen lassen. Danach muss das Serum so bald wie möglich durch Zentrifugation abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

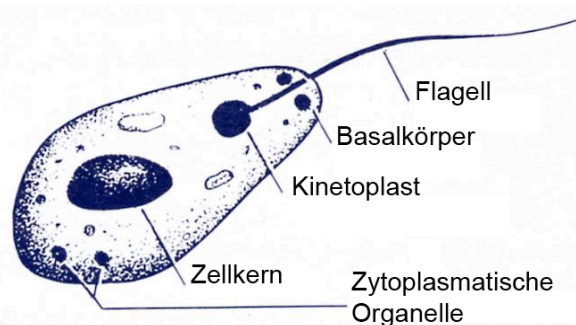
**Störsubstanzen:** Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrowachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, weil diese Zustände zu falschen Ergebnissen führen können. Proben mit sichtbaren Verunreinigungen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

**Aufbewahrung:** Serumproben können bei einer Temperatur von 2-10°C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20°C eingefroren werden. Serum darf nicht in einem Kühlschrank oder Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden.

**ACHTUNG:** Wiederholtes Einfrieren/Auftauen von Patientenproben ist zu vermeiden. Andernfalls können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die korrekte Interpretation der Ergebnisse hängt von der deutlichen Erkennung der verschiedenen morphologischen Merkmale des Organismus von *Crithidia luciliae* ab.



Die Außenhülle der meisten Protozoen besteht aus einer Pellikula aus Lipoprotein. Im Inneren dieser Pellikula liegt die Plasmamembran. Die Plasmamembran umgibt das Zytoplasma, bestehend aus a) der äußeren Ektoplasmaschicht mit Basalkörper und Flagellum und b) dem Endoplasma, einem innen sehr flüssigen Zytoplasma, das den Nukleus, Kinetoplast und andere Organellen enthält.

Pellikula, Plasmamembran, Basalkörper und Flagellum gelten als permanente Bestandteile des Organismus, wobei einzelne Zellen nur eine geringe Lagevariabilität aufweisen. Auch wenn der Kinetoplast im Allgemeinen näher am Basalkörper liegt als der Nukleus, kann die exakte Position dieser Organelle auf Grund der flüssigen Konsistenz des Endoplasma von Zelle zu Zelle variieren.

Um den Kinetoplast vom Nukleus klar zu unterscheiden, die positive Kontrollvertiefung ansehen. Der Kinetoplast befindet sich stets näher am Flagellum (siehe Abbildung oben). Die negative Kontrollvertiefung zeigt keine Verfärbung des Kinetoplast, die positive Kontrollvertiefung weist dagegen eine Verfärbung des Kinetoplast auf.

**NUR EINZELNE, GENAU DEFINIERTE ORGANISMEN IN JEDEM FELD ABLESEN. DIE MORPHOLOGIE DER EINZELNEN ORGANISMEN KANN AUF GRUND FIXIERUNG WÄHREND DES ANWACHSENS VARIIEREN.**

## QUALITÄTSSICHERUNG

In den für die Qualitätssicherung vorgesehenen Vertiefungen sollten Positiv-, Negativ- und PBS-Kontrollläufe durchgeführt werden. Die positive Kontrollvertiefung sollte eine dunkelblau-purpurne Färbung im Kinetoplast von *Crithidia lucilliae* hervorrufen, mit oder ohne Verfärbung des Nukleus. Die negative Kontrollvertiefung sollte keine Verfärbung des Kinetoplast zeigen. Die PBS-Kontrollvertiefung wird zur Beobachtung nicht-spezifischer Verfärbungen durch das Antikörper-Reagens verwendet und sollte keine Blaufärbung aufweisen. Wenn die Kontrollvertiefungen nicht die beschriebenen Merkmale aufweisen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

## OPTIONALE TITRIERBARE KONTROLLE

Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:10-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des Kinetoplast sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

In unserem Labor wurde der mittlere Titrierungsbereich ( $\pm$  eine Zweifach-Verdünnung nach oben oder unten, vom Mittel ausgehend) für diese Chargennummer festgelegt; dieser gilt als Richtwert. Mit Hilfe dieser Kontrolle kann jedes Labor die Reproduzierbarkeit (Präzision) seiner nDNA-Tests selbst einschätzen. Da diese Kontrolle nicht als Indikator für die Titrierungsgenauigkeit vorgesehen ist, muss jedes Labor seinen eigenen mittleren Titrierungsendpunkt für diese Probe festlegen und sollte diese Informationen zur Bewertung der Reproduzierbarkeit (Präzision) ihrer Testläufe heranziehen.

Für jede Chargennummer wurde durch mehrere Testläufe mit dieser titrierbaren Kontrolle, unter Verwendung des Colorzyme<sup>®</sup> nDNA-Testsystems von Immuno Concepts, ein mittlerer Titrierungswert ermittelt. Chargennummer, mittlere Titrierung und Titrierungsbereich ( $\pm$  eine Zweifach-Verdünnung nach oben oder unten, ausgehend vom Mittel) sind auf dem Etikett des Fläschchens verzeichnet und sollten zur Messung der Systemleistung herangezogen werden.

Die in unserem Labor ermittelten Werte können von Ihren eigenen Werten abweichen. Zahlreiche Faktoren können Einfluss auf Ihre Ergebnisse nehmen; hier einige Beispiele:

1. Korrekte Ausrichtung des Lichtwegs im Mikroskop. Dazu die Anweisungen in der Gebrauchsanweisung zu Ihrem Mikroskop lesen.
2. Die Blendenöffnung des Objektivs. Die Blendenöffnung bestimmt die Menge des aufgenommenen Lichts und die Auflösung des Objektivs. Die Blendenöffnung ist seitlich am Objektiv aufgedruckt.
3. Präzision und Genauigkeit der Verdünnungstechnik, der Ausrüstung und der Ausführung der Testverfahren.

## INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

Zum Betrachten der *Crithidia* wird eine 400-fache Vergrößerung empfohlen.

**Negative Reaktion:** Ein Serum ist als negativ für Antikörper gegen nDNA zu werten, wenn die Kinetoplast-Verfärbung geringer als oder gleich der negativen Kontrollvertiefung ist. Eine Verfärbung des Nukleus ohne Verfärbung des Kinetoplast ist ebenfalls als negativ für Antikörper gegen nDNA zu werten.

**Positive Reaktion:** Ein Serum ist als positiv zu werten, wenn der Kinetoplast eine deutlich sichtbare und stärkere Verfärbung als die Negativkontrolle aufweist.

**Titrierungen:** Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:10-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des Kinetoplast sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

## ENZYM-VERFÄRBUNGSINTENSITÄT

Der Grad der Verfärbungsintensität hat keinen nachweisbaren klinischen Wert und nur begrenzten Wert als Titrierungs-Indikator (32). Um die Interpretation zu vereinfachen, Screening-Ergebnisse als stark positiv oder positiv werten und entsprechend titrieren.

**Stark positive Reaktion:** Dunkelblau bis stark dunkelblau-purpurne Verfärbung mit klar erkennbarer Kontur des Kinetoplast.

**Positive Reaktion:** Schwache Blau- bis Purpurfärbung, mit größeren Verfärbungsunterschieden zwischen den Organismen. Die Zellkontur kann bei einigen Organismen weniger klar definiert sein, wobei die Mehrzahl der Organismen immer noch eine deutlich sichtbare Verfärbung des Kinetoplast aufweist.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

**Screening:** Die Ergebnisse des Tests sind als stark positiv, positiv oder negativ bei 1:10-Verdünnung anzugeben.

**Titrierung:** Die letzte Reihenverdünnung, in der eine deutliche Verfärbung des Kinetoplast sichtbar ist, ist als Ergebnis anzugeben. Ergebnisse mit einer starken Reaktion bei einer Verdünnung 1:640 sind als größer als 1:640 anzugeben.

### VERFÄRBUNGSEIGENSCHAFTEN

**Kinetoplast:** leichte oder periphere Verfärbung des Kinetoplast in der Nähe des Flagellum-Bereichs des Organismus.

*Ergebnis:* positiv für Antikörper gegen nDNA.

*Antigene:* nDNA.

*Assoziierte Erkrankung:* hohe Titrierungen lassen auf aktiven SLE schließen (20), oder, falls SLE bereits früher diagnostiziert wurde, auf ein Wiederauftreten der Krankheit oder mangelhaftes Therapie-Ansprechen (21-23).

**Nukleus:** leichte, periphere oder gefleckte Verfärbung des Nukleus.

*Ergebnis:* Negativ für Antikörper gegen nDNA.

*Antigene:* mit dem Nukleus assoziierte Antigene (21-23).

*Assoziierte Erkrankung:* positive Verfärbung des Nukleus kann auf nicht-spezifische Bindegewebskrankheit schließen lassen.

**HINWEIS:** Positive ANA-Ergebnisse mit HEp-2 oder anderen Substraten erzeugen in der Regel keine entsprechende Verfärbung des Nukleus bei *C. luciliae*. Beispielsweise erzeugt ein geflecktes ANA mit HEp-2 keine fleckige Verfärbung des Nukleus bei *C. luciliae*.

**Basalkörper:** leichte Verfärbung der beiden Sphären an der Verbindungsstelle des Körpers des Organismus mit dem Flagellum im Ektoplasma.

*Synonyme Bezeichnung:* Basalfüße.

*Ergebnis:* Negativ für Antikörper gegen nDNA.

*Antigene:* mit dem Basalkörper assoziierte Antigene.

*Assoziierte Erkrankung:* wurde von SLE-Patienten berichtet, bei denen keine Verfärbung des Kinetoplast oder des Nukleus auftrat (33).

**Flagellum:** Verfärbung des Flagellums des Organismus.

*Synonyme Bezeichnung:* Schwanzbereich des Organismus.

*Ergebnis:* Negativ für Antikörper gegen nDNA.

*Antigene:* mit dem Flagellum assoziierte unbekannte Antigene.

*Assoziierte Erkrankung:* nicht bekannt.

## BESCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises von anti-nDNA-Antikörpern eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
2. Lediglich auf Grund eines positiven Testergebnisses für anti-nDNA-Antikörper sollte keine Behandlung initiiert werden. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Einige Medikamente, darunter Procainamid und Hydralazin, können eine Lupus erythematosus-ähnliche Erkrankung induzieren. Patienten mit Medikamenten-induziertem LE können unter Umständen positive ANA aufweisen, die in der Regel gegen nukleäre Histone gerichtet sind; es wurde aber auch über Antikörper gegen nDNA berichtet (34-35).
4. Auch wenn ein hoch-titriertes nDNA als starkes Indiz für SLE zu sehen ist, ist der diagnostische Wert gering. Das Ergebnis sollte vielmehr in Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtprofil des Patienten bewertet werden. Im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom, progressiver systemischer Sklerose, Dermatomyositis, diskoidem Lupus erythematosus und gemischter Bindegewebskrankheit sind oft niedrige Titrierungen von anti-nDNA vorhanden (21).
5. Patienten, die sich einer Therapie mit Steroiden unterziehen, können negative Ergebnisse für nDNA-Antikörper aufweisen (36).

## ZU ERWARTENDE WERTE

Der zu erwartende Wert in der normalen Population ist negativ bei einer Screening-Verdünnung von 1:10. Einige Medikamente, wie etwa Hydralazin, können die Produktion von nDNA-Antikörpern induzieren (34-35).

# LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

## NACHWEIS:

Das Immuno Concepts Colorzyme® nDNA Testsystem wurde mit dem indirekten Immunofluoreszenz-nDNA-Test von Immuno Concepts auf Äquivalenz getestet, indem 49 Serumproben, repräsentativ für diverse Autoantikörper wie sie in systemischen rheumatischen Erkrankungen auftreten, einem Screening unterzogen und titriert wurden. Bei allen getesteten Seren bestand eine 100%-ige Korrelation der Enzym-Ergebnisse mit den Immunofluoreszenz-nDNA von Immuno Concepts (37).

Das Immuno Concepts Fluoreszenz-nDNA Testsystem wurde zuvor bereits im Vergleich mit zwei anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenz-Antikörpertests evaluiert (37). Im Rahmen der Studie wurden 103 Serumproben von normalen Personen untersucht sowie von Patienten mit u.a. folgenden Diagnosen: systemischer Lupus erythematosus (SLE), gemischte Bindegewebskrankheit (MCTD), Raynaud'sche progressive systemische Sklerose - CREST Variante (PSS-CREST), rheumatoide Arthritis (RA), juvenile rheumatoide Arthritis (JRA) und anderen Bindegewebskrankheiten. Die Seren wurden mit den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Screening-Verdünnungen getestet. Die Ergebnisse der Studie sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

TABELLE 1

DIAGNOSE	Anzahl der Patienten	Immuno Concepts Positive 1:10	Hersteller A Positive 1:10	Hersteller B Positive 1:10
SLE	30	13	13	11
MCTD/Überlappung	6	0	0	0
Raynaud'sche PSS-CREST	17	0	0	0
RA	2	0	0	0
JRA	4	0	0	0
Andere gemischte Bindegewebskrankheit	9	0	0	0
Hospitalisierte Kontrollen	11	1	1	1
Normale Kontrollen	24	0	0	0

Die hospitalisierten Kontrollen, die bei allen *Critidia luciliae* nDNA Tests positiv waren, hatten Immunokomplex-Nierenkrankung, welche die Kriterien für eine Diagnose von SLE nicht erfüllen.

## TESTGENAUIGKEIT









Zehn nDNA positive Seren wurden bei drei Gelegenheiten doppelt titriert. In allen Fällen wurden sämtliche Titrierungen innerhalb plus oder minus einer zweifachen Verdünnung reproduziert (37). Die Ergebnisse entsprechen den Standards für Fluoreszenz-Antikörperreagenzien, wie sie von den Centers for Disease Control in Atlanta, Georgia aufgestellt wurden.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Robbins, W. C., Holman, H. R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. J. Biol. Chem. 254:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, C. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.

21. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
22. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 6:131-140, 1976.
23. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. *Clin. Exp. Immunol.* 22:9-15, 1975.
24. Simpson, L. Behavior of the Kinetoplast of *Leishmania tarentolae* Upon Cell Rupture. *J. Protozool.* 15:132-136, 1968.
25. Aarden, L. A., DeGroot, E. R., Feltkamp, T.E.W. Immunology of DNA. III *Crithidia lucilliae*, a Simple Substrate for the Determination of Anti-dsDNA with the Immunofluorescent Technique. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254:505-515, 1975.
26. Laurent, M., van Assel, S., Steinert, M. Kinetoplast DNA. A Unique Macromolecular Structure of Considerable Size and Mechanical Resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:278-284, 1971.
27. Deegan, M. J., Walker, S. E., Lovell, S. E. Antibodies to Double Stranded DNA. A Comparison of the Indirect Immunofluorescent Test Using *Crithidia lucilliae* and the DNA-Binding Assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 69:599-604, 1978.
28. Feltkamp, T. E.W., van Rossum, A. L. Antibodies to Salivary Duct Cells, and Other Autoantibodies, in Patients with Sjögren's Syndrome and Other Idiopathic Autoimmune Diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 3:1-16, 1968.
29. Murakami, W. T., van Vunakis, H., Grossman, L., et al. Immunochemical Studies of Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. II. Characterization of the Active Antigen. *Virology* 14:190-197, 1961.
30. Locker, J. D., Medof, M. E., Bennett, R. M., et al. Characterization of DNA Used to Assay Sera for Anti-DNA Antibodies; Determination of the Specificities of Anti-DNA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Non-SLE Rheumatic Disease States. *J. Immunol.* 118:694-701, 1977.
31. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A. Current Status of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) in Systemic Rheumatic Diseases. In: *Immunoassays in the Clinical Laboratory*. Ed. by Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S., pp. 317-338. Alan R. Liss, Inc., New York, NY. 1979.
32. Nakamura, R. M., Peebles, C. L., Molden, D. P.: et al. Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases, *Laboratory Med.* 15:190-198, 1984.
33. Vogel, J. C., Roberts, J. L., Lewis, E. J. A Non-Anti-DNA Antibody Detected With the *Crithidia lucilliae* Anti-DNA Assay. *New Engl. J. Med.* 303:458-459, 1980.
34. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. *J. Rheum.* 2:215-220, 1975.
35. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. *J. Rheum.* 2:167-171, 1975.
36. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia lucilliae* Method. *Arthritis Rheum.* 22:321-328, 1979.
37. Data on file. Immuno Concepts, Incorporated.

**Im Falle der Beschädigung der Schutzverpackung treten Sie vor Gebrauch bitte mit Immuno Concepts in Verbindung.**

	Hersteller		Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft
	Temperatur-Beschränkung		Enthält genügendes für <n> Tests
	Beachten Sie die Anwendungsvorschriften		In vitro Medizinische Diagnoseeinheit
	MDSS GmbH Schiffgraben 41 D-30175 Hannover, Germany		

Immuno Concepts, N.A. Ltd.    9825 Goethe Road, Suite 350    Sacramento, CA. 95827  
 Technical Support    USA: 1.800.251.5115    Outside USA: 1.916.363.2649  
 Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)



# COLORZYME® NDNA TESTVERFAHREN

**Hinweis: Wenn das Labor ein automatisches Pipettiersystem benutzt, müssen die Verfahrensweisen und die Empfehlungen des Herstellers befolgt werden. Das Pipettiersystem muss für die verwendeten Verdünnungen, Abgabevolumen und Inkubationszeiten, wie unten beschrieben, programmiert werden.**

## 1. PUFFER (PBS) REKONSTITUIEREN

Inhalt eines Beutels mit PBS-Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Die PBS-Waschpufferlösung kann verschlossen und gekühlt bei 2-25 °C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.

## 2. FARBREAGENS REKONSTITUIEREN

Inhalt eines Beutels mit 150 ml deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Gut durchmischen, bis das Pulver völlig aufgelöst ist. Dieses Farb-reagens ist 30 Tage stabil, wenn es bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Behälter aufbewahrt wird. Dieses Farb-reagens kann bis zu 30 Tage lang, oder bis eine Farbänderung oder Ausfällung zu beobachten ist, wiederverwendet werden. Trübungen oder Schimmern bei Wiederverwendung, ohne sichtbare Ausfällungen, sind normal. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farb-reagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

## 3. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN

Screening: Patientenproben 1:10 verdünnen, indem 0,1 ml (100 µl) Serum zu 0,9 ml rekonstituiertem PBS zugegeben werden. Semiquantitative Titrierung: Zur Herstellung von zweifachen Reihenverdünnungen der Screening-Proben (z.B. 1:20, 1:40, 1:80...1:640), 0,5 ml von der 1:10 Verdünnung trennen und mit 0,5 ml PBS mischen, um eine Verdünnung von 1:20 zu erzielen, anschließend auf diese Weise weitere Verdünnungen herstellen.

## 4. VERDÜNNEN DES OPTIONALEN TITRIERBAREN KONTROLLSERUMS

Die optionale titrierbare Kontrolle als unverdünnte Patientenprobe behandeln. Das Kontrollserum 1:10 verdünnen, indem 0,1 ml (100 µl) Kontrollserum zu 0,9 ml rekonstituiertem PBS zugegeben werden. Zweifache Reihenverdünnungen des titrierbaren Kontrollserums wie oben beschrieben herstellen.

## 5. SUBSTRATTRÄGER VORBEREITEN (20-25 µl/Vertiefung)

Objektträger aus der Folie entnehmen und Kontrollserum wie folgt in den Kontrollvertiefungen platzieren: Tropfflasche mit Kontrollserum umdrehen und vorsichtig drücken, bis an der Spitze ein Tropfen austritt. Den Tropfen vorsichtig in die entsprechende Kontrollvertiefung geben, dabei direkten Kontakt der Tropferspitze mit der Oberfläche des Objektträgers vermeiden. 1 Tropfen (20-25 µl) Patientenprobe in die nummerierten Vertiefungen geben.

**ACHTUNG: DIREKTER KONTAKT DER TROPFERSPITZE MIT DEM OBJEKTTRÄGER KANN DAS ANTIGEN-SUBSTRAT BESCHÄDIGEN.**

## 6. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei

Zimmertemperatur, 18-25°C)  
Objektträger in eine feuchte, bedeckte Schale legen (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Papierhandtuch). 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-25°C) abgedeckt inkubieren lassen.

## 7. PBS-SPÜLUNG

Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und mit Spritzflasche, Pasteur- oder serologischer Pipette kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.

**HINWEIS:** Um bei Objektträgern mit 13 Vertiefungen eine Kreuzkontamination zu vermeiden, den PBS auf die Mittellinie des Objektträgers spritzen, dabei den Träger zuerst in Richtung Vertiefungen 1-5 neigen, anschließend in Richtung Vertiefungen 6-10.

## 8. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)

Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden. PBS-Waschlösung nach Gebrauch entsorgen.

## 9. ENZYM-ANTIKÖRPERREAGENS (Vertiefungen mit 10-12 Tropfen befüllen)

Jeweils einen Objektträger aus dem PBS-Puffer nehmen und 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen. Überschüssiges Wasser durch seitliches Ausklopfen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen. Objektträger sofort wieder in die Inkubationskammer geben und die Vertiefungen vollständig mit Enzym-Antikörperreagens füllen; beginnend mit einem Tropfen pro Vertiefung. Vorgang für alle Objektträger wiederholen. Das Enzym-Antikörperreagens wurde titriert, um das auf dem Objektträger verbliebene deionisierte oder destillierte Wasser zu kompensieren. **HINWEIS:** Es ist wichtig, dass die Vertiefungen auf dem Objektträger während dieses Vorgangs nicht austrocknen, andernfalls kann das Substrat beschädigt werden. DEN OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE ENZYM-ANTIKÖRPERREAGENS STEHEN LASSEN.

## 10. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei

Zimmertemperatur, 18-25°C)  
Deckel auf Inkubationsschale legen. Objektträger 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-25°C) inkubieren lassen.

## 11. PBS-SPÜLUNG

Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.

## 12. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)

Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden.

## 13. FARBREAGENS INKUBIEREN (30 Minuten bei Zimmertemperatur, 18-25°C)

Jeweils einen Objektträger aus dem PBS entnehmen, 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen und Objektträger seitlich ausklopfen oder auf Saugpapier oder Papierhandtuch auslegen, um verbliebenes Wasser zu entfernen. Objektträger sofort in einen Coplin-Glaszylinder mit aktiviertem Farb-reagens einlegen und 30 Minuten inkubieren.

## 14. PBS-SPÜLUNG

Jeweils einen Objektträger aus dem Coplin-Glaszylinder nehmen und auf allen Seiten 4-5 Sekunden lang mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen. Jeden mit PBS gespülten Objektträger in einen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllten Coplin-Glaszylinder einlegen, bis alle Objektträger aus dem Farb-reagens entfernt sind. Sofort mit Schritt 15 weiter machen.

## 15. DECKGLAS AUFSETZEN

Jeweils einen Objektträger aus dem destillierten oder deionisierten Wasser nehmen und Objektträger auf Saugpapier oder Papierhandtuch ausgebreitet seitlich ausklopfen, um verbliebenes Wasser zu entfernen. DEN OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE DECKGLAS STEHEN LASSEN. 4-5 Tropfen semipermanentes Montagemedium entlang der Mittellinie jedes Objektträgers hinzugeben. Deckglas vorsichtig in Position bringen; dabei Luftsinschlüsse vermeiden; hierzu das Deckglas vorsichtig an einem Ende des Objektträgers aufsetzen und auf das andere Ende herablassen.

**HINWEIS:** Überschüssiges Eindeckmedium auf dem Objektträger kann zu ungenügender Auflösung der Zellen (verschwommenes Bild) führen. Überschüssiges Montagemedium kann vom Objektträger entfernt werden, indem das Deckglas mit Saugpapier abgetupft wird, ohne es dabei zu bewegen. Die Objektträger können sofort ausgewertet oder für längere Zeit bei 2-10 °C ohne Reaktivitätsverlust aufbewahrt werden.

**TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG:** +1-916-363-2649  
oder via E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com