

MASTAFLUOR™ Combi-3

Objektträger beschichtet mit Magen/Niere/Leber Gewebeschnitten (Ratte)

Slides coated with combined stomach / kidney tissue sections (rat)
on stomach / kidney / liver tissue (rat)

Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /
Usage *in vitro* uniquement



Deutsch: Seiten 02–04



English: Pages 05–07

MASTAFLUOR™ Combi-3 (ANA, AMA, ASMA, APCA, LKM)

REF 616123

10 x 10 Wells

Hersteller / Manufactured by:
Fabriqué par:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriumspräparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
www.mastgrp.com
mast@mast-diagnostica.de

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
MAST House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
www.mastgrp.com
sales@mastgrp.com

Distribué par:

MAST DIAGNOSTIC
115, Rue Jules Barni
80000 Amiens
France
Tél.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
www.mastgrp.com
service-commercial@mast-diagnostic.fr

Verwendungszweck

MASTAFLUOR™ Combi-3 Objektträger für Immunfluoreszenztests dienen dem Nachweis von Antikörpern auf Magen-/ Leber-/ Nierengewebe der Ratte. Auf dem Objektträger können bei Verwendung geeigneter Reagenzien folgende Antikörper nachgewiesen werden: ABBA, AMA, ANA, ARA, ARIA, ASMA, APCA, LKM.

Packungsinhalt

Inhalt	100 Tests	Spezifikation
Objektträger	10 x 10 Wells	Beschichtet mit kombinierten Magen-/ Leber-/ Nierengewebeschnitten (Ratte)

Haltbarkeit und Lagerung

MASTAFLUOR™ Combi-3 Objektträger sind bis zu dem auf dem Etikett vermerkten Haltbarkeitsdatum verwendbar, sofern sie bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

Serum- und Plasmaproben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten sie bei -20 °C eingefroren werden. Allerdings sollten wiederholte Einfrier- / Auftauzyklen vermieden werden.

Warnhinweise

- Die Objektträger dienen nur zur *in-vitro* Diagnostik.
- Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsinformation lesen. Die Testdurchführung mit den verwendeten Reagenzien validieren.
- Keine Objektträger nach dem Verfallsdatum verwenden.
- Die allgemeinen Arbeitsschutzrichtlinien für das Arbeiten mit potentiell infektiösen Materialien einhalten. Es wird empfohlen, entsprechende Schutzkleidung zu tragen. Den Test immer in geeigneten Laborräumen abarbeiten.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Wenn möglich, sollten Einmalspitzen und Einmalreaktionsgefäße verwendet werden. Es dürfen nur gereinigte Laborgläser verwendet werden, die nach dem Spülen mit destilliertem Wasser abgespült wurden.
- Nur Wasser von hoher Qualität verwenden (destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität).
- Ein Austrocknen der Wells verhindern.
- Die Objektträger nicht direktem Sonnenlicht oder anderen vergleichbar extremen Bedingungen aussetzen.
- Probenmaterialien und Einmalartikel, die mit dem Probenmaterial in Kontakt gekommen sind, entsprechend gängiger Vorschriften zur Entsorgung potentiell infektiösen Materials vernichten. Arbeitsflächen mit einem geeigneten Flächendesinfektionsmittel gemäß der Anwendungsvorschrift dekontaminieren. Glasgefäße o.ä. können bei 121 °C autoklaviert werden.

- Seren, die erkenntlich mikrobiologisch kontaminiert sind, nicht verwenden.
- Hämolytische oder lipämische Seren können bei 56 °C inaktiviert werden

Testdurchführung (empfohlen bei Verwendung test-spezifischer MASTAFLUOR Reagenzien)

- Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
- 1 Sachet des PBS-Puffers mit 1 L destilliertem Wasser oder Wasser höherer Qualität lösen.
- Die Patientenserum 1:20 mit PBS verdünnen.
Beispiel: 10 µL Serum + 190 µL PBS
- Die Kit-Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden.
- Den eingeschweißten Objektträger an der Einkerbung aufreißen und vorsichtig aus der Alutüte herausnehmen.
- Je 20–25 µL der Kontrollen oder der verdünnten Patientenproben auf ein Testfeld pipettieren. Die Probe soll das ganze Testfeld bedecken. Mit der Pipettenspitze dabei nicht über das Testfeld kratzen.
- Die Objektträger in eine feuchte Kammer legen. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Nach der Inkubation die Objektträger vorsichtig aus der feuchten Kammer nehmen und mit PBS aus einer Spritzflasche vorsichtig auf die Mitte des Objektträgers zielen, um die Seren von den Testfeldern abzuspülen. Dabei nie direkt mit dem Spritzstrahl auf die Testfelder zielen.
- Die Objektträger in einer Küvette mit PBS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur waschen. Ein Wechseln des Puffers nach 5 min erhöht die Waschstringenz.
- Die Objektträger aus dem Puffer nehmen und den Puffer kurz von der Maske abklopfen, indem man mit der Längsseite des Objektträgers auf eine saugfähige Unterlage klopft. Nie mit einem Papiertuch o. ä. über die Testfelder wischen!
- Die Objektträger sofort in die feuchte Kammer legen und einen Tropfen des FITC-Konjugats (20–25 µL) auf jedes Testfeld tropfen. Das Konjugat soll das ganze Testfeld bedecken. Die Testfelder dürfen nach dem Waschschritt zu keinem Zeitpunkt eintrocknen!
- Die Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Es empfiehlt sich, das Mikroskop etwa 10–15 min vor Ablauf der Konjugatinkubation anzuschalten, damit die

Lampe einbrennen kann. Bitte stets die Betriebsanleitung des Mikroskops beachten.

14. Nach der Konjugatinkubation die Objektträger wie unter den Pkt. 9 und 10 beschrieben waschen.
15. Optional können dem letzten Waschschrift 3–5 Tropfen Evans Blue zur Gegenfärbung zugegeben werden. Mit der Gegenfärbung erreicht man eine stärkere Kontrastierung des Präparates.

Nach der Evans Blue Färbung die Objektträger kurz in eine Küvette mit frischem PBS tauchen, um Reste des Evans Blue abzuspülen.

16. Einen kleinen Tropfen Eindeckmedium auf jedes Testfeld tropfen und mit einem Deckglas den Objektträger eindecken.

Hinweis: Wird zuviel Eindeckmedium auf die Testfelder getropft, so kann das Deckglas beim Mikroskopieren leicht verrutschen. Zudem kann überschüssiges Eindeckmedium zu einer Lichtstreuung führen, was eine hohe Hintergrundfluoreszenz zur Folge hat. Überschüssiges Eindeckmedium kann mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden, indem man dieses an die Längsseite des Objektträgers hält.

17. Die Reaktionen können nun mit einem Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es empfiehlt sich dabei eine 200- bis 400-fache Vergrößerung.

Interpretation der Reaktionen (nur zutreffend bei Verwendung der geeigneten MASTFLUOR Reagenzien)

Validierung des Tests

Zur korrekten Beurteilung der Patientenproben sollten immer die positive und negative Kontrolle mit herangezogen werden.

Zusätzliche spezifische Kontrollen können separat bezogen werden.

Interpretation der Patientenreaktionen

Fluoreszenzmuster positiver Proben: Suchtiter 1:20

Die Beurteilung erfolgt stets im Vergleich mit positiver - und negativer Kontrolle.

ABBA Bei vorhandenen Antikörpern gegen Bürstensaum (ABBA) zeigen sich Fluoreszenzen des Bürstensaums der proximalen Tubuli. Hierbei handelt es sich um einen heterophilen Antikörper (HA).

AMA Bei Vorhandensein von antimitchondrialen Antikörpern zeigt sich eine feingranuläre zytoplasmatische Fluoreszenz der Nierentubuli des Nierenmarks und der Rinde. Die distalen Tubuli sind reicher an Mito-

chondrien und weisen daher im Gegensatz zu den proximalen Tubuli eine intensivere Fluoreszenz auf. Die Belegzellen des Magens reagieren deutlich.

ANA ANA-positive Proben rufen eine Fluoreszenz der Zellkerne in allen Geweben hervor. Ist keine bzw. eine mattgrüne Anfärbung der Kerne zu sehen, ist die Probe als negativ zu bewerten. Stark positive Proben sollten austitriert werden, um verdeckte Fluoreszenzmuster oder Mischreaktionen zu erkennen. Zur Differenzierung der unterschiedlichen Muster (z. B. homogen, nukleolär, gesprenkelt, centromer) sollte die HEP-2 Zelle als Substrat verwendet werden.

ARA Hierbei treten Fluoreszenzen der Tubuluskapillaren (peritubuläre Fasern), der Bowmann'schen Kapsel sowie der perivaskulären Fasern (Arteriolen, Arterien) der Niere auf.

ARIA ARIA rufen Fluoreszenzen der Hauptzellen der Magenschleimhaut hervor (Parietalzellen sind negativ).

ASMA Eine Fluoreszenz der glatten Muskelfasern, der Blutgefäße von Niere und Magen, der Muscularis mucosa und Tunica muscularis des Magens und den interglandulären kontraktiven Fibrillen der Mucosa des Magens geben Hinweis auf das Vorhandensein von ASMA.

APCA Eine alleinige feingranuläre Fluoreszenz der Parietalzellen (Belegzellen) der Magenschleimhaut deuten auf APCA hin. Da AMA auch mit den Parietalzellen reagiert, müssen bei der APCA-Beurteilung antimitchondriale Antikörper AMA (an Nierentubuli) ausgeschlossen werden.

LKM Zwei unterschiedliche Fluoreszenzmuster werden beim Nachweis dieser Antikörper im kombinierten Gewebeschnitt sichtbar:

- Eine brillante cytoplasmatische Fluoreszenz der Hepatozyten, die Kernregion erscheint dunkel.
- Eine im Vergleich dazu schwache Fluoreszenz des dritten Segments der proximalen Tubuli, das erste und zweite Segment zeigt nur eine geringe bzw. keine Fluoreszenz.

Hinweis: Die distalen Tubuli erscheinen immer negativ (AMA lassen sich hieran bevorzugt nachweisen.)

Der jeweilige Endtiter ergibt sich aus der Verdünnungsstufe, in der die Patientenprobe eine einfach positive Fluoreszenz aufweist.

Schwache Fluoreszenzen bei Titern von 1:20 bis 1:80, bzw. Unklarheiten bezüglich des klinischen Bildes sollten anhand

einer Verlaufskontrolle (Proben in Abstand von 3–4 Wochen gewonnen) abgeklärt werden.

Diagnostische Relevanz

ABBA

> 1:20 HA können durch Fluoreszenzmuster, die mit echten Autoantikörpern verwechselt werden können, zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

AMA

1:20–1:80 Eine positive Reaktion findet man bei diversen Lebererkrankungen.

> 1:160 Es liegt eine biliäre Zirrhose vor. AMA-Titer bleiben über längere Zeit und trotz der Therapie relativ konstant. Daher erweisen sich Titerbestimmungen als Therapiekontrolle wenig zweckmäßig.

ANA

1:20–1:80 Eine positive Reaktion findet man häufig bei der Rheumatischen Arthritis (RA) und anderen Bindegewebserkrankungen (MCTD). Ein Titeranstieg kann auf einen aktiven SLE hinweisen. Konstante Titer liegen bei chronischen bzw. behandelten Autoimmunerkrankungen vor.

> 1:160 Es liegt eine akute Autoimmunerkrankung vor, wobei es sich hierbei in über 80 % der Fälle um einen SLE handelt.

ARA

> 1:20 Nachzuweisen bei Morbus Crohn und bei Kindern mit unbehandelter Zöliakie.

ARIA

> 1:20 Vereinzelt nachweisbar bei SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung

ASMA

1:20–1:80 Eine positive Reaktion findet man bei diversen Lebererkrankungen, viraler Hepatitis und der primär biliären Zirrhose. Hierbei können die Titer bis unter die Nachweisgrenze abfallen. Niedrige ASMA-Titer sind auch bei Patienten mit Gallengangverschluss, alkoholisch bedingter Zirrhose, SLE und bei ca. 2 % der Normalbevölkerung nachzuweisen.

> 1:160 Es liegt eine aktive chronische Hepatitis vor. Im Gegensatz zur viralen Hepatitis fallen die Titer nur geringfügig ab und können über mehrere Jahre hinweg persistieren. Patienten mit infektiöser Mononukleose weisen ebenfalls hohe ASMA-Titer auf.

APCA

APCA-Titer haben keine Aussagekraft hinsichtlich des Krankheitsstadiums. Der Antikörpernachweis sollte durch Bestimmung des Intrinsic-Faktors bzw. histopathologisch abgeklärt werden.

LKM

> 1:20 LKM-Antikörper des Typs II sind bei der medikamenten-induzierten Hepatitis zu finden.

Negative Proben zeigen keine oder nur eine mattgrüne Fluoreszenz.

Literatur

1. Thomas L.: Labor und Diagnose, 5. Auflage (1998), TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt

Intended Use

MASTAFLUOR™ Combi-3 slides are coated with rat liver / kidney / stomach tissue sections for the immunofluorescence detection of specific autoantibodies in human serum or plasma.

Kit Contents

Content	100 Tests	Specifications
Slides	10 x 10 Wells	Coated with combined tissue sections of rat stomach, liver and kidney

Stability and Storage

MASTAFLUOR™ Combi-3 slides are stable until the end of shelf life as indicated on the labels. The slides should be stored at 2–8 °C.

Serum and plasma specimens may be stored at 2–8 °C for up to 3 days prior to use or for longer storage at -20 °C. Repeated freezing and thawing of specimens should be avoided.

Warnings and Precautions

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure.
3. Do not use kit beyond the expiry date.
4. Wear appropriate protective clothing and use appropriate facilities.
5. Do not mouth pipette.
6. Use disposable plastic ware where ever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. Use distilled water or water of higher quality.
8. Do not allow wells to dry out during the assay procedures.
9. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
10. Contaminated plastic ware should be disposed and incinerated. Contaminated glassware should either be autoclaved at 121 °C or decontaminated with a solution of 2.5 % sodium hypochlorite. All liquid waste should be decontaminated appropriately e.g. using sodium hypochlorite.
11. Microbial contaminated serum samples should not be used.
12. In the event that haemolysed or lipemic serum must be used, heat inactive at 56 °C before use.

Test Procedure (valid only for assay specific MASTAFLUOR reagents)

1. Allow all materials to reach room temperature (at least 20 °C) prior to use.
2. Reconstitute one sachet of PBS powder with 1 litre of distilled water or water of higher quality.
3. Dilute patient samples 1 : 20 with PBS.
Example: 10 µL serum + 190 µL of PBS.
4. Controls are supplied ready to use and must not be diluted.
5. Carefully remove the required number of slides from their sachets and mark accordingly. Hold the slide at the edge and do not touch the wells. Place the slides in a moist chamber.
6. Apply 20–25 µL of diluted specimens and ready to use controls to respective wells on the slides according to a prepared work format. Ensure that all the wells are covered and that serum does not escape from the wells.

Direct contact of a pipette tip with the slide surface may result in damage to the antigen substrate and should be avoided.
7. Cover the moist chamber and incubate at room temperature for 30 min.
8. After incubation wash slides carefully with PBS from a wash bottle, taking care not to direct the jet onto the test wells. This may be done by directing the jet of PBS along the centre of the slide, tilting the slide first towards wells 1–5 and then towards 6–10.
9. Immerse the slides in a staining dish or Coplin jar containing PBS and wash for 15 min. A change of the PBS buffer after 5 min increases washing strength.
10. Remove slides one at a time from the staining jar and drain off any excess PBS. Using a blotter, dry the area outside wells. Wipe off any excess PBS from the back of the side. Do not touch the well surface.
11. Immediately transfer the slide to a moist chamber and add 20–25 µL of FITC-conjugate to each well. Ensure that all the wells are covered by the conjugate.
12. Incubate slides at room temperature in a covered moist chamber in the dark for 30 minutes.
13. Switch on microscope 15 minutes prior to use.
14. After incubation wash the slides with PBS as in steps 9 and 10.
15. Optional counter stain: add 3–5 drops of Evans Blue to the PBS wash buffer in the last 5 min washing step. The counter stain increases the contrast of the immunofluorescent pattern.

Briefly wash the slides in PBS to remove all Evans Blue.

16. Apply one small drop of Mounting Medium to each well on a slide. Place a cover slip on the slide and read the results immediately. Take care not to trap air pockets under the cover slip.

Excess Mounting Medium on a slide may result in high background fluorescence due to light scattering. Remove excess Mounting Medium with a paper towel avoiding any direct movement of the cover slip.

17. Examine under a fluorescence microscope at a total magnification of 200x to 400x.

Interpretation of Results (valid for assay specific MASTAFLUOR reagents)

Test Validation

Specimen are assessed by way of comparison with the controls included in the test.

Additional specific controls can be ordered separately.

Interpretation of Specimen Results

Screening titre: 1:20

The evaluation should always be performed with positive and negative controls

The combined tissue section allows the differentiation of various antibodies within one test area and may thus be applied as a diagnostic test for the following autoimmune antibodies (in case of diverse antibodies it is advisable to look for further diagnostic identification).

ABBA The presence of ABBA is indicated by fluorescence of the brush border of the proximal tubules. These are heterophilic antibodies.

AMA The presence of anti-mitochondrial antibodies displays a fine granular cytoplasmatic fluorescence of the renal tubules. The distal tubules are richer in mitochondria and therefore display a more intense fluorescence in contrast to the proximal tubules.

ANA ANA-positive samples cause a fluorescence of the cell nuclei of the liver tissue. The sample should be assessed as negative if no or a faintly green staining of the nuclei is visible. Highly positive samples should be titrated to determine hidden fluorescence patterns or mixed reactions. For the differentiation of various patterns (e.g. homogenous, nucleolar, speckled, centromere) the HEp-2 cell should be used as the substrate.

ARA There is a fluorescence of the peritubular fibres (tubular capillaries). Bowman's capsule, as well as the perivascular fibres (arterioles, arteries) of the kidney.

ARIA Anti-ribosomal antibodies (ARIA) are demonstrated by a fluorescence of the gastric main cells, but not of the parietal cells.

ASMA The presence of ASMA is indicated by a fluorescence of the smooth muscle fibres of the blood vessels of kidney and stomach, of muscularis mucosa, tunica muscularis ventriculi, as well as the interglandular fibrillae of stomach mucosa.

APCA Fine granular fluorescence of the parietal cells in the gastric mucous membrane indicates APCA. Since AMA also reacts with parietal cells, anti-mitochondrial antibodies (renal tubules) should be excluded in the ACA assessment.

LKM Two different fluorescent may be seen on the combined tissue sections at the same time:

- A brilliant diffuse cytoplasmatic fluorescence of the hepatocyte cytoplasm, whereby the nucleus region remains dark.
- A comparatively weak fluorescence of the third segment of proximal kidney tubules, whereby the first and second segments display only a weak or no fluorescence.

Note: The distal tubules always appear negative which is where anti-mitochondrial antibodies more often bind.

The appropriate final serum dilution is defined by a positive fluorescence. Weak fluorescence of the cell nuclei with titres between 1:20 and 1:80 or vagueness with respect to the clinical results should be checked by way of monitoring control. In such a case the samples should be collected about every 3 weeks and similarly tested.

Diagnostic Relevance

ABBA

> 1:20 HA generate patterns of fluorescence which may be mistaken for genuine antibodies and though produce false positive results.

AMA

1:20–1:80 A positive reaction is found in several liver diseases.

> 1:160 Indicates biliary cirrhosis. AMA titres remain constant over a long period of time and therapy so that the determination of titre as a measure of therapy control is not useful.

ANA

1:20–1:80 A positive reaction is seen frequently in rheumatoid arthritis (RA) and MCTD. An increase in titre may indicate active SLE. Constant titres are observed in chronic or treated autoimmune diseases.

> 1:160 An acute autoimmune disease is indicated, whereby in 80 % of cases SLE is present.

ARA

> 1:20 ARA are found in Crohn's disease and in children with untreated celiac disease.

ARIA

> 1:20 Occasionally found in SLE patients with renal disorder.

ASMA

1:20–1:80 A positive reaction is found in several liver diseases, viral hepatitis and primary biliary cirrhosis. However, the titres here may fall below the determination border. Low titres may be observed in patients with gallbladder infections, alcoholic cirrhosis, SLE and in 2 % of the normal healthy population.

> 1: 160 Chronically active hepatitis is indicated. In contrast to viral hepatitis the titres fall only slightly and may persist for several years. Patients with infectious mononucleosis may also show high ASMA titres.

APCA

The APCA titre provides no information about the diseases state of the patient. The antibody determination should be evaluated together with the measurement of Intrinsic factor and/or results from histopathology.

LKM




> 1:20 Type II LKM antibodies may be observed in drug-induced hepatitis.

Negative specimen should show no green fluorescence; a green staining without fluorescence may be visible.

References

1. Thomas L.: Labor und Diagnose, 5. Auflage (1998), TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt

**Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:
 Explanations of abbreviations and icons used on labels:**

SLIDES	Objekträger	Slides
LOT	Charge	Batch
REF	Bestellnummer	Order code
	Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use
	Verfallsdatum	Expiry Date
	Lagerung bei	Storage