

# MASTAFLUOR™ Combi-3

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörpern  
auf Magen-/ Leber-/ Nierengewebe (Ratte)

Immunofluorescence assay for the detection of antibodies  
on stomach / liver / kidney tissue (rat)

Test d'immunofluorescence pour la détection des anticorps  
dans le sérum et le plasma humain sur estomac/foie/rein (rat)

## Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



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



Deutsch:            Seiten 02–06



English:            Pages 07–11



Français:           Pages 12–16

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

REF 606023

10 x 10 Tests

**Ebenfalls auf einem Ratten-Magen-/ Nieren-Gewebeschnitt zu detektieren: ABBA, ARA, ARIA**  
**Combined kidney stomach tissues slides enable also detection of: ABBA, ARA, ARIA**  
**Coupes de tissus d'estomac et de rein pour également la détection des ABBA, ARA, ARIA**

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

MASTAFLUOR™ Combi-3 – 2008-06-23

## Einführung

Autoimmun-Erkrankungen werden per definitionem durch autoimmune Reaktionen ausgelöst, die durch autoreaktive B- oder T-Zellen charakterisiert sind. Die Autoimmunität ist dabei eine Folge des Verlusts der Selbsttoleranz des Immunsystems. Eine Reihe plausibler Hypothesen zur Entstehung autoimmuner Erkrankungen sind bekannt, u. a. werden auch genetische und/oder Umwelteinflüsse mit verantwortlich gemacht.

**ABBA** Heterophile Antikörper (HA) sind Antikörper, die mit tierischem Gewebe reagieren, obwohl sie nicht gegen die spezifischen Gewebeantigene gerichtet sind. Es werden Fluoreszenzmuster erzeugt, die mit echten Autoantikörpern verwechselt werden können. Sie sind wahrscheinlich gegen Blutgruppenantigene gerichtet und können somit falsch-positive Ergebnisse hervorrufen.

**AMA** Antimitochondriale Antikörper (AMA) reagieren überwiegend mit der phospholipidreichen inneren Membran der Mitochondrien. AMA treten vorwiegend bei Erkrankungen wie der primär biliären Zirrhose, dem Pseudo-LE Syndrom und verschiedenen Formen der chronisch aggressiven Hepatitis auf. Hochtitrige AMA-Befunde findet man vorwiegend bei nichteitrigen Gallenentzündungen oder der primär biliären Zirrhose (positive Befunde in ca. 90 %). Hier treten die Antikörper schon vor der klinischen Manifestation auf und werden auch durch eine Therapie des Krankheitsverlaufes kaum beeinflusst. Niedrige Antikörpertiter werden bei der Sklerodermie, dem Sjögren-Syndrom, der rheumatoiden Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen beobachtet.

**ANA** Unter dem Begriff „antinukleäre Antikörper“ werden alle Autoantikörper zusammengefasst, die mit Antigenen im Zellkern reagieren. Sie sind wichtige Marker zur Diagnose des systemischen Lupus erythematoses (SLE), der Sklerodermie, des Sjögren-Syndroms oder unterschiedlicher Bindegewebskrankheiten, die im allgemeinen mit dem Begriff MCTD (Mixed Connective Tissue Disease) bezeichnet werden. Obwohl ANA-Nachweise für diese Erkrankungen einen hohen Aus-sagewert haben, sollte die endgültige Diagnose mit dem klinischen Bild abgeklärt werden. Antinukleäre Antikörper können aber auch bei „nicht autoimmunbedingten“ Erkrankungen auftreten. Besonders bei Infektionen, viralen Erkrankungen, Hepatiden, infektiöser Mononukleose, Leukämien, Lymphomen, Melanomen. Daneben werden ANA oft bei chronischer Hepatitis, primärer Zirrhose, Thyreoditis und allergischer Enzephalitis nachgewiesen. Niedrige ANA-Titer werden gelegentlich auch durch Medikamente hervorgerufen bzw. können bei Gesunden vorhanden sein.

**ARA** Anti-Retikulin-Antikörper (ARA) sind nachzuweisen bei Morbus Crohn und bei Kindern mit unbehandelter Zöliakie.

**ARIA** Antiribosomale-Antikörper (ARIA) sind vereinzelt nachweisbar bei SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung.

**ASMA** Antikörper gegen glatte Muskulatur treten bei zahlreichen Lebererkrankungen, beispielsweise bei akuten und chronischen Hepatiden, bei der primären biliären Zirrhose sowie anderen Formen der Leberzirrhose auf. Darüber hinaus dient der Nachweis von ASMA zur Diagnose von SLE, infektiöser Mononukleose, Brust- und Ovarkarzinomen und malignen Melanomen.

**APCA** Zirkulierende Antikörper gegen Strukturen der Parietalzellen (Belegzellen) der Magenschleimhaut sind in der Regel auf eine perniziöse Anämie zurückzuführen. Sie können aber auch bei anderen Erkrankungen z. B. des Magens (chronische atrophische Gastritis, Magengeschwüre), der Schilddrüse (Hashimoto Thyreoditis, Myxödem), seltener bei Eisenmangelanämie, Diabetes mellitus und bei älteren Menschen auftreten.

**LKM** LKM (liver-kidney-microsomal) Antikörper sind gegen das Cytoplasma der Hepatozyten und der proximalen Tubuli in der Nierenrinde gerichtet.

Man unterscheidet LKM-Typ I + LKM-Typ II Antikörper

LKM-Antikörper des Typ 1 sind Marker für eine Subgruppe der autoimmunen chronisch-aktiven Hepatiden, die bevorzugt bei Kindern, insbesondere Mädchen auftritt. Diese Form der Hepatitis wird möglicherweise durch Hepatitis A oder andere Hepatitisviren, jedoch nicht durch den Typ B hervorgerufen.

LKM-Antikörper des Typ 2 sind bei der medikamenten-induzierten Hepatitis zu finden.

## Verwendungszweck

Der MASTAFLUOR™ Combi-3 ist ein Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörpern auf Magen-/ Leber-/ Nierengewebe der Ratte.

## Testprinzip

Das verdünnte Probenmaterial (Serum, Plasma) wird zusammen mit den erforderlichen Kontrollen auf die Testfelder des Objektträgers pipettiert. Die Testfelder sind mit einem Magen/Leber/Niere-Gewebeschnitt (Ratte) beschichtet. Sofern spezifische Antikörper im Probenmaterial sind, binden diese an entsprechende Antigenstrukturen auf den Testfeldern und bilden mit diesen einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex. Unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. An die spezifischen Komplexe binden dann in einer Konjugatreaktion FITC-gekoppelte Anti-Human-Globulin-Antikörper (polyvalent). Anschließend werden unspezifisch oder nicht gebundene Reaktionskomponenten durch einen Waschschrift entfernt.

Im Fluoreszenzmikroskop werden die Testfelder ausgewertet. Liegen Antikörper gegen AMA, ANA, ASMA, APCA oder LKM im Serum vor, kommt es zu spezifischen Fluoreszenzen im Rattenmagen-, Leber- und Rattennierengewebe.

## Packungsinhalt

Inhalt	100 Tests	Spezifikation
Objektträger	10 x 10 Wells	Beschichtet mit einem Gewebeschnitt aus Magen-/Leber-/ Nierengewebe (Ratte)
Positives Kontrollserum	0,5 mL	Positives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN <sub>3</sub>
Negatives Kontrollserum	0,5 mL	Negatives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN <sub>3</sub>
FITC-Konjugat	3 mL	FITC-markiertes Anti-human-Immunglobulin Konjugat polyvalent, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN <sub>3</sub>
Evans Blue	3 mL	Gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN <sub>3</sub>
Eindeck-medium	3 mL	Gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN <sub>3</sub>
PBS	2 Sachets	Je 1 Sachet in 1 L destilliertem Wasser lösen, pH 7,2 ± 0,2

## Zusätzlich benötigte Materialien

1. Sterile Reaktionsgefäße
2. Mikropipetten und dazu passende Spitzen
3. Küvetten
4. Feuchte Kammer
5. Messkolben oder Messbecher
6. Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität
7. Pinzette
8. Deckgläser
9. (Wasch-) Pufferflasche
10. Fluoreszenzmikroskop mit einem 490 nm Anregungsfilter (Blauanregung) und 510 nm Sperrfilter und Farbteiler.

## Haltbarkeit und Lagerung

Der MASTFLUOR™ Combi-3 ist bis zu dem auf dem Etikett vermerkten Haltbarkeitsdatum verwendbar, sofern er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Der PBS-Puffer ist nach dem Auflösen 30 Tage stabil, wenn er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

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

1. Der Kit dient nur zur in-vitro Diagnostik.
2. Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsinformation lesen. Die Testdurchführung nicht ohne Validierung modifizieren.
3. Keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum verwenden.
4. 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.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Wenn möglich, sollten Einmalpipettenspitzen und Einmalreaktionsgefäße verwendet werden. Es dürfen nur gereinigte Laborgläser verwendet werden, die nach dem Spülen mit destilliertem Wasser abgespült wurden.
7. Die im Kit enthaltenen Kontrollen sind Humanseren, die auf Antikörper gegen das HI-Virus und HBsAg getestet wurden und für negativ befundet wurden. Dennoch sollten alle menschlichen Seren als potentiell infektiös angesehen werden, weil Infektionen nicht mit letzendlicher Sicherheit ausgeschlossen werden können.

8. Nur Wasser von hoher Qualität verwenden (destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität).
9. Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen mischen.
10. Eine Kontamination der Reagenzien vermeiden; die Flaschen immer wieder mit den richtigen Deckeln verschließen. Zum Pipettieren immer eine neue Pipettenspitze für jeden Arbeitsschritt verwenden.
11. Ein Austrocknen der Wells verhindern.
12. Die Objektträger nicht direktem Sonnenlicht oder anderen vergleichbar extremen Bedingungen aussetzen.
13. 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.
14. FITC-Konjugate sollen nicht dem Sonnen-, UV- oder Fluoreszenzlicht ausgesetzt werden. Sofern die Konjugate nicht benötigt werden, diese lichtgeschützt aufbewahren.
15. Seren, die erkenntlich mikrobiologisch kontaminiert sind, nicht verwenden.
16. Hämolytische oder lipämische Seren können bei 56 °C inaktiviert werden.
17. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Beide Reagenzien reagieren bei Inkorporation toxisch. Natriumazid kann mit Metallen (Blei, Kupfer) explosive Metallazidverbindungen bilden. Bei der Entsorgung von Azidreagenzien über den Laborabfluss ist daher mit viel Wasser nachzuspülen.

## Testdurchführung

1. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
2. 1 Sacht des PBS-Puffers mit 1 L destilliertem Wasser oder Wasser höherer Qualität lösen.
3. Die Patientenserum 1:20 mit PBS verdünnen.  
Beispiel: 10 µL Serum + 190 µL PBS
4. Die Kit-Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden.
5. Den eingeschweißten Objektträger an der Einkerbung aufreißen und vorsichtig aus der Alutüte herausnehmen.
6. 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.

7. Die Objektträger in eine feuchte Kammer legen. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 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.
9. Die Objektträger in einer Küvette mit PBS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur waschen. Ein Wechseln des Puffers nach 5 min erhöht die Waschstringenz.
10. 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!
11. 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 Waschschrift zu keinem Zeitpunkt eintrocknen!
12. Die Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
13. 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.
16. Einen kleinen Tropfen Eindeckmedium auf jedes Testfeld tropfen und mit einem Deckglas den Objektträger eindecken.

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

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

### 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 antimitochondrialen Antikörpern zeigt sich eine feingranuläre zytoplasmatische Fluoreszenz der Nierentubuli des Nierenmarks und der Rinde. Die distalen Tubuli sind reicher an Mitochondrien 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 kontraktile Fibrillen der Muco-

sa des Magens geben Hinweis auf das Vorhandensein von ASMA.

**APCA** Eine alleinige feingranuläre Fluoreszenz der Parietalzellen (Belegzellen) der Magenschleimhaut deutet auf APCA hin. Da AMA auch mit den Parietalzellen reagiert, müssen bei der APCA-Beurteilung antimitochondriale 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 Bindegeweberkrankungen (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.

## Grenzen des Nachweisverfahren / Kreuzreaktionen

1. Kreuzreaktionen sind nicht bekannt.
2. Der MASTAFLUOR™ Combi-3 ist hoch-sensitiv und hoch-spezifisch. Bei Vorhandensein von diversen Antikörpern ist es ratsam, weitere differentialdiagnostische Nachweise anzuschließen. Dennoch sollte dieser Test, wie auch jeder andere Labortest, nicht allein zur Festlegung der Diagnose verwendet werden, sondern immer in Verbindung mit anderen Testverfahren, der Anamnese und dem klinischen Bild des Patienten.

## Literatur

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

## Introduction

Autoimmune diseases are triggered by autoimmune reactions, which are characterised by auto-reactive B and T cells. Autoimmunity is the cause of a loss of self-tolerance of the immune systems. A number of plausible hypotheses are discussed, which also included genetic and/or environmental influences.

**ABBA** Heterophilic antibodies (HA) are antibodies which react with animal tissue, although they are not active against specific tissue antigens. These generate patterns of fluorescence which may be mistaken for genuine antibodies. They are probably active against blood group antigens and thus produce false positive results.

**AMA** Anti-mitochondrial antibodies (AMA) predominantly react with the inner membrane of the mitochondria (rich in phospholipids). AMA mostly appear with diseases such as primary biliary cirrhosis, pseudo-LE syndrome and various forms of chronic aggressive hepatitis. High titre AMA results are mainly found with non-suppurating gallbladder infections or primary biliary cirrhosis (positive results at about 90 %). In these cases antibodies appear before the clinical symptoms and will hardly be influenced by therapy during the course of the disease. Low antibody titres are observed with scleroderma, Sjögren syndrome, rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases.

**ANA** The term anti-nuclear antibodies (ANA) comprises all antibodies which react with antigens in the cell nucleus. They are important markers in the diagnosis of the systemic lupus erythematosus (SLE), scleroderma, Sjögren syndrome or various connective tissue diseases, commonly designated as MCTD. Although the ANA detection for these diseases proves highly important, the final diagnosis should be checked against the clinical results. Anti-nuclear antibodies may also occur with non autoimmune based diseases, especially in the case of infections, viral diseases, hepatitis, infectious mononucleosis, leukaemia, lymphoma, melanomas and others. Furthermore, ANA are often detected with chronic hepatitis, primary cirrhosis, thyroiditis and allergic encephalitis. Low ANA titres may occasionally be caused by medication or may be present in healthy people.

**ARA** Anti-reticulon antibodies (ARA) are found in Crohn's disease and in children with untreated celiac disease.

**ARIA** Anti-ribosomal antibodies (ARIA) are occasionally found in SLE patients where renal disorder is involved.

**ASMA** Antibodies against smooth, unstriated muscle occur in various liver diseases, for example acute and

chronic hepatitis, primary biliary cirrhosis and other forms of liver cirrhosis. Furthermore, the detection of ASMA supports the diagnosis of SLE, infectious mononucleosis, breast and ovarian carcinoma and malignant melanomas.

**APCA** Circulating antibodies against the structures of the parietal cell of the gastric mucosa are generally due to pernicious anemia.

They may, however, also be detected with other diseases of the stomach (chronic atrophic gastritis, gastric ulcer), diseases of the thyroid (Hashimoto's thyroiditis, myxedema), and more rarely with hypoferric anemia, diabetes mellitus and in older patients.

**LKM** Liver-kidney-microsomal antibodies (LKM) are predominantly directed at lipoproteins located in the membranes of rough and smooth endoplasmic reticulum.

Two types of LKM (Type I + II) may be differentiated:

- LKM type 1 antibodies are a subgroup of chronic active autoimmune hepatitis which are found mainly in children with being more present in young girls. This type of hepatitis is caused by hepatitis A or other hepatitis virus infection, but never by hepatitis B virus infection.
- LKM type 2 antibodies are found in cases of drug-induced hepatitis.

## Intended Use

MASTFLUOR™ Combi-3 provide an indirect immunofluorescence test system for the detection of specific antibodies on stomach / liver / kidney tissue sections (rat).

## Test Principle

IFA slides are coated with combined sections of kidney stomach tissues. Diluted patient serum or plasma is incubated on the wells of the slide. In the presence of specific antibodies a stable antigen-antibody complex is formed. Unspecific or unbound antibodies are removed in a washing step. Specific immune complexes are then detected by a polyvalent FITC-conjugated anti-human-antibody. Again unspecific or non-bound antibodies are removed in a washing step. Results could be read visually using an immunofluorescence microscope.

Positive reactions show specific fluorescent reactions on stomach, liver and kidney tissue.

## Kit Contents

Content	100 Tests	Specifications
Slides	10 x 10 Wells	Coated with combined tissue section of stomach, liver and kidney sections (rat tissue)
Positive control	0,5 mL	Positive serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN <sub>3</sub>
Negative control	0,5 mL	Negative serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN <sub>3</sub>
FITC-conjugate	3 mL	Anti-human-globulin polyvalent, FITC-conjugate, ready to use, contains < 0.1 % NaN <sub>3</sub>
Evans Blue	3 mL	Ready to use, contains < 0.1 % NaN <sub>3</sub>
Mounting Medium	3 mL	Ready to use, contains < 0.1 % NaN <sub>3</sub>
PBS	2 Sachets	1 sachet to be diluted in 1 L of distilled water, pH 7.2 ± 0.2

## Materials Required but not Provided

1. Sterile test tubes
2. Micropipettes and tips
3. Staining dish or Coplin jar
4. Moist chamber
5. Volumetric flask for PBS
6. Distilled water or water of higher quality
7. Forceps
8. Transmitted or epi-fluorescence microscope with a 490 nm excitation filter and a 510 nm barrier filter
9. Cover slips
10. Wash bottle

## Stability and Storage

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

Reconstituted PBS powder should be stored at 2–8 °C for up to 30 days.

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 plasticware where ever possible. Reusable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. Sera provided have been tested for antibodies to HIV and for HBsAg and found to be negative. However, they should be treated as potentially infectious materials and capable of transmitting diseases. No guarantee is given that the sera are free of infection or microbial contamination.
8. Use distilled water or water of higher quality.
9. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
10. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
11. Do not allow wells to dry out during the assay procedures.
12. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
13. 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.



14. Do not expose the FITC-conjugate at any stage to strong sunlight, UV or fluorescent light. Keep in a dark place whenever possible.
15. Microbial contaminated serum samples should not be used.
16. In the event that haemolysed or lipemic serum must be used, heat inactive at 56 °C before use.
17. Sodium azide is used as a preservative as marked. It may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. Always dispose by flushing to drain with plenty of water.

### Test Procedure

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

#### 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.

## **Limitations / Cross-reactions**

1. No cross-reactivity is known.
2. MASTAFLUOR™ Combi-3 has been demonstrated to be highly sensitive and specific, however, results should be considered along with all serological tests, clinical history and other aspects of patient management to be considered diagnostically significant.

## **Performance**

Inter-assay and intra-assay variances are not detectable in respect to control fluorescence intensity.

## **References**

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

## Introduction

Les maladies auto immunes sont dues à des réactions immunes au niveau cellulaire et/ou humoral. Ces réactions dirigées normalement contre des éléments étrangers peuvent dans certaines circonstances se diriger contre son propre organisme. Un nombre d'hypothèses plausibles sont discutées dont les influences génétiques et / ou environnementales.

**ABBA** Les anticorps hétérophiles (HA) réagissent non spécifiquement avec les tissus animaux. La fluorescence due à ces anticorps peut être confondue avec celles obtenue avec les anticorps intacts. Les anticorps HA sont probablement actifs contre les antigènes du groupe sanguin en produisant alors des résultats faussement positifs.

**AMA** Les anticorps AMA sont dirigés contre la membrane interne des mitochondries (riche en phospholipides). Les AMA apparaissent lors de cirrhoses biliaires primitives (CBP) de pseudo LED et de formes diverses d'hépatites chroniques. Les titres sont élevés lors d'infection non purulente de la vessie et de CBP (90% de positivité). Dans ces cas, les anticorps apparaissent avant les symptômes cliniques et sont fortement influencés par la thérapie.

Des titres faibles sont observés lors de sclérodémie, syndrome de Sjögren, arthrite rhumatoïde, et autres maladies auto immunes.

**ANA** Les anticorps antinucléaires ANA sont dirigés contre les antigènes du noyau cellulaire. Bien que se soient des marqueurs importants pour le diagnostic du Lupus érythémateux disséminé (LED), de la sclérodémie, du syndrome de Sjögren et de diverses connectivites couramment désignée sous le nom MCTD (connectivites mixtes), le diagnostic doit être posé en conjonction avec les connaissances cliniques. Les anticorps antinucléaires peuvent apparaître aussi lors de maladies non auto immunes ; particulièrement lors d'infection, de maladie virale, d'hépatite, de mononucléose infectieuse, de leucémie, de lymphome, de mélanome et autres. De plus les anticorps antinucléaires sont rencontrés chez les patients souffrant d'hépatite chronique et de CBP, de thyroïdite et d'encéphalite allergique. Des titres faibles peuvent apparaître chez les sujets sains ou sous médication.

**ARA** Les anticorps anti-réticuline ARA sont présents lors de maladie de Crohn et chez les enfants coeliaques non traités.

**ARIA** Les anticorps anti-ribosome ARIA sont rencontrés occasionnellement chez les patients ayant un LED avec des désordres rénaux.

**ASMA** Les anticorps anti-muscle lisse sont présents dans diverses pathologies hépatiques comme l'hépatite chronique aiguë, la CBP et autres formes de cirrhose du foie. La détection de ASMA est indiquée pour le diagnostic du LED, de la mononucléose infectieuse, des cancers du sein et des ovaires et des mélanomes malins.

**APCA** Les anticorps circulants dirigés contre les cellules pariétales de la muqueuse gastrique sont généralement dus à une anémie pernicieuse. Ils peuvent cependant être également détectés lors d'autres maladies stomacales (atrophie gastrique chronique, l'ulcère gastrique)

**LKM** Les anticorps LKM ( Liver Kidney Microsome) réagissent avec le lipoprotéines de la membrane du réticulum endoplasmique lisse et rugueux. Il existe deux types d'anticorps anti- LKM :

Les anticorps LKM de type 1 sont présents chez un sous groupe d'hépatite chronique active auto immune principalement chez l'enfant et plus souvent chez les jeunes filles. Ce type d'hépatite est causé par le virus de l'hépatite A et d'autres infections virales hépatiques mais jamais par le virus de l'hépatite B.

Les anticorps LKM de type 2 sont présents lors d'hépatite induite par des médicaments.

## Utilisation

MASTAFLUOR™ Combi 3 est un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps spécifiques sur coupes de tissus d'estomac et de foie et de rein de rat.

## Principe

Les lames d'immunofluorescence sont recouvertes de coupes de tissus de rein et d'estomac et de foie de rat.

Le sérum ou le plasma de patient est incubé dans les puits de lame. Un complexe immun est formé en présence d'anticorps spécifiques. Les anticorps non spécifiques ne formant pas de complexes sont éliminés lors d'un lavage. Les complexes immuns spécifiques sont détectés par immunofluorescence à l'aide d'un conjugué FITC humain. Après incubation le conjugué en excès est éliminé lors d'une étape de lavage. Les résultats sont lus sous microscope à immunofluorescence. Les échantillons positifs ont une fluorescence spécifique sur les coupes de tissus de rein et d'estomac et de foie de rat.

## Composition

Contenu	100 Tests	Spécifications
Lames	10 x 10 Puits	Recouvertes de coupes de rein et d'estomac et de foie de rat.
Contrôle positif	0,5 mL	Sérum positif Prêt à l'emploi contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$
Contrôle négatif	0,5 mL	Sérum négatif Prêt à l'emploi contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$
Conjugué FITC	3 mL	Conjugué antiglobuline humaine polyvalente FITC Prêt à l'emploi contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$
Bleu d'Evans	3 mL	Prêt à l'emploi, contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$
Milieu de montage	3 mL	Prêt à l'emploi, contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$
PBS	2 Sachets	1 sachet à diluer dans 1 L d'eau distillée $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$

## Matériels nécessaires non fournis

1. Tubes stériles.
2. Micropipettes et embouts.
3. Bac à coloration ou jarre de Coplin.
4. Chambre humide.
5. Flacon gradué pour le tampon PBS.
6. Eau distillée ou de qualité supérieure.
7. Pincettes.
8. Microscope à transmission ou à épifluorescence avec un filtre d'excitation à 490 nm et un filtre barrière à 510 nm
9. Lamelles.
10. Flacon de lavage.

## Conservation

MASTAFLUOR Combi 3 se conserve jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Le coffret doit être conservé à 2–8°C.

Le tampon PBS reconstitué se conserve 30 jours à 2–8°C.

Les prélèvements de sérum et de plasma se conservent à 2–8°C pendant 3 jours avant utilisation ou à -20°C au-delà. Éviter de décongeler et de recongeler les échantillons.

## Précaution d'emploi

1. Les réactifs du coffret sont uniquement à usage de diagnostic *in vitro*.
2. Lire soigneusement la notice d'utilisation avant de commencer le test. Ne pas modifier la procédure.
3. Ne pas utiliser le coffret au-delà de la date de péremption indiquée sur le coffret.
4. Porter des vêtements adaptés à ce type de manipulation et utiliser un équipement de protection approprié.
5. Ne pas pipeter avec la bouche.
6. Utiliser du matériel en plastique dans la mesure du possible. La verrerie doit être lavée soigneusement et rincée sans détergent avant utilisation.
7. Les sérums fournis ont été testés et se sont avérés négatifs pour la présence d'anticorps anti-HIV et d'antigène HBs. Cependant, ils doivent être considérés comme potentiellement dangereux et infectieux. Il est recommandé d'être extrêmement vigilant lors de la manipulation d'échantillon d'origine humaine.
8. Utiliser de l'eau distillée ou de qualité supérieure.
9. Ne pas échanger les réactifs de différents lots car les réactifs sont calibrés pour chaque lot.
10. Ne pas intervertir les réactifs ou les bouchons des flacons. Changer de pipettes ou d'embouts entre chaque échantillon.
11. Ne pas laisser sécher les puits entre les différentes étapes.
12. Protéger les lames des rayons du soleil ou de la lumière directe pendant l'incubation.
13. Le matériel en plastique contaminé doit être éliminé par incinération. La verrerie contaminée doit être stérilisée à 121°C pendant 30 minutes à l'autoclave ou décontaminée avec une solution d'eau de Javel à 2,5% (v/v). Les projections doivent être éliminées à l'aide d'un matériel absorbant et la zone de manipulation désinfectée avec de l'eau de Javel à 5% (v/v). Tous les liquides contaminés doivent être désinfectés de manière appropriée à l'aide d'eau de Javel ou par autoclavage.
14. Protéger le conjugué FITC des UV, de la fluorescence et des rayons du soleil. Conserver le conjugué à l'obscurité.
15. Éliminer les échantillons de sérums contaminés par des micro-organismes.
16. Les sérums lipoïdes ou hémolysés doivent être traités avant utilisation.
17. L'azoture de sodium utilisé comme conservateur est un produit toxique en cas d'ingestion. L'azoture de sodium peut réagir avec les conduites en plomb ou en cuivre et former des sels explosifs. Disposer toujours d'un système de rinçage à l'eau suffisamment important.

## Procédure

1. Ramener le matériel à température ambiante (min à 20°C) avant utilisation.
2. Reconstituer un sachet de poudre de tampon PBS dans 1 litre d'eau distillée ou de qualité supérieure.
3. Diluer les échantillons de sérum au 1 :2 avec le PBS (50 µL de sérum dans 50 µL de PBS)
4. Les sérums de contrôles prêts à l'emploi ne doivent pas être dilués.
5. Préparer soigneusement le nombre de lames nécessaires et les identifier. Éviter de toucher les puits. Mettre les lames en chambre humide.
6. Déposer 20 à 25 µL d'échantillon et de contrôles prêts à l'emploi respectivement dans chaque puits selon un plan de travail établi. S'assurer que tous les puits sont recouverts et que les sérums ne débordent pas des puits. Éviter le contact direct des embouts de la micropipette avec la surface de la lame afin de ne pas endommager le substrat.
7. Incuber les lames en chambre humide fermée à température ambiante pendant 30 minutes.
8. Après incubation, laver soigneusement les lames avec du tampon PBS en évitant de diriger le jet de la pissette directement sur les puits. Pour cela, laver les puits de 1 à 5 dirigés vers le bas tout en maintenant le jet vers le centre de la lame. Laver les puits 6 à 10 de la même façon.
9. Immerger les lames dans le bac à coloration ou dans la jarre de Coplin contenant du tampon PBS sous agitation magnétique pendant 15 minutes avec un changement de tampon PBS au bout de 5 minutes.
10. Sortir les lames une par une du bac à coloration et éliminer le PBS en excès. Sécher les lames autour des puits à l'aide d'un papier buvard. Sécher l'excès de PBS sur le dos de la lame. Ne pas toucher la surface des puits.
11. Transférer immédiatement la lame dans une chambre humide. Déposer 20 à 25 µL de conjugué FITC dans chaque puits. Vérifier que tous les puits sont bien recouverts de conjugué.
12. Incuber les lames à température ambiante dans une chambre humide fermée pendant 30 minutes à l'obscurité
13. Allumer le microscope 15 minutes avant utilisation.
14. Après incubation, laver les lames avec du PBS en reprenant les étapes 9 et 10.
15. Contre coloration optionnelle : ajouter 3 à 5 gouttes de Bleu d'Evans dans le tampon de lavage PBS dans les 5 dernières minutes de l'étape de lavage. La contre coloration augmente le contraste des profils de fluorescence.

Laver rapidement les lames avec le tampon PBS pour éliminer tout le bleu d'Evans.

16. Déposer une petite goutte de milieu de montage dans chaque puits. Recouvrir d'une lamelle et lire les résultats immédiatement. Éviter de piéger des bulles d'air entre la lame et la lamelle.

Un excès de milieu de montage sur la lame peut engendrer un important bruit de fond dû à la dispersion de la lumière. Éliminer l'excès de milieu de montage avec du papier absorbant en évitant de déplacer la lamelle.

17. Examiner sous microscope à fluorescence au grossissement 200X ou 400X.

## Interprétation des résultats

### 1- Validation du test

Les résultats des échantillons de patients obtenus en les comparant aux contrôles inclus dans le coffret.

Des contrôles spécifiques complémentaires peuvent être commandés séparément.

## Interprétation des résultats des échantillons

La valeur seuil de dépistage est 1:20.

Le test doit toujours être effectuée avec les contrôles positifs et négatifs inclus.

ABBA. Fluorescence des bordures en brosse des tubules proximaux par les aux anticorps hétérophiles.

AMA. Fluorescence granulaire du cytoplasme des tubules rénaux par les anticorps anti-mitochondries. Les tubules distaux qui sont plus riches en mitochondries présentent parfois une fluorescence plus intense par rapport à celle sur les tubules proximaux.

ANA. Fluorescence des cellules nucléaires du foie par les anticorps ANA . Un échantillon est négatif si une coloration verte est faible ou inexistante. Les échantillons positifs doivent être titrés pour déterminer les profils de fluorescence cachés ou les réactions mixtes. Pour la différenciation de différents profils (homogène, nucléolaire, moucheté, centromérique) les cellules Hep2 doivent être utilisées comme substrat.

ARA. Fluorescence des fibres tubulaires périphériques (tubules capillaires)

Capsule de Bowman et fibres vasculaires périphériques (artérioles et artères) du rein.

ARIA. Fluorescence des cellules principales gastriques mais pas des cellules pariétales.

**ASMA** Fluorescence des fibres des muscles lisses des vaisseaux sanguins du rein et de l'estomac, de la *muscularis mucosa*, de la tunique musculaire ventriculaire aussi bien que des fibrilles inter granulaires de la muqueuse stomacale.

**APCA** Fluorescence granulaire fine des cellules pariétales de la membrane de la muqueuse gastrique. Puisque les AMA réagissent aussi avec les cellules pariétales, les AMA (tubules rénales) doivent être exclus du diagnostic ACA

**LKM** Deux types de fluorescence peuvent apparaître sur plusieurs les coupes en même temps :

- Fluorescence brillante cytoplasmique et diffuse du cytoplasme de hépatocytes avec des noyaux restant sombres.
- Plus faible fluorescence du tiers inférieur des tubules proximales avec une fluorescence faible ou absente des deux premiers tiers.

Remarque: les tubules distaux apparaissent toujours négatifs car les anticorps AMA les masquent le plus souvent.

Le titre final du sérum correspond à la plus forte dilution donnant encore une fluorescence. Une fluorescence faible des noyaux cellulaires avec des titres compris entre 1:20 et 1:80 ou un connaissance vague des aspects cliniques nécessite d'effectuer un nouveau contrôle avec les mêmes tests au bout de trois semaines

### Valeur diagnostique

#### **ABBA**

>1 :20

Les HA peuvent donner des résultats faussement positifs en étant confondus avec les anticorps intacts.

#### **AMA**

1:20-1:80

Réaction positive dans plusieurs pathologies hépatiques.

>1:160

Indique une cirrhose biliaire. Les titres en AMA sont stable au cours de la maladie et lors d'une thérapie si bien qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer des dosages au cours d'une thérapie.

#### **ANA**

1:20-1:80

Positivité fréquente lors d'arthrite rhumatoïde et de MCDT.

Une augmentation du titre peut indiquer un LED. Un titre stable est observé lors de maladies auto immunes chroniques ou traitées.

>1:160

Maladie auto immune aigue correspondant dans 80 % des cas à un LED.

#### **ARA**

>1:20

Maladie de Crohn et enfant coeliaque non traités.

#### **ARIA**

>1:20

Parfois LED avec désordres rénaux.

#### **ASMA**

1:20-1:80

Pathologie hépatiques diverses, hépatite virale et CBP. Les titres peuvent chuter sous le seuil de positivité. Des titres faibles sont parfois observés chez les patients avec des infections de la vésicule biliaire, cirrhoses alcooliques, LED et à raison de 2% de la population saine.

>1:160

Hépatite chronique active. Contrairement aux hépatites virales, les titres chutent légèrement mais persiste plusieurs années. Les patients avec une MNI ont des titres élevés d'ASMA.

#### **APCA**

Les anticorps APCA ne donnent aucune information sur le statut de la maladie. La détermination des anticorps doit être évaluée avec la recherche du facteur intrinsèque et/ou les résultats de l'histologie.

#### **LKM**

>1 :20

Anticorps anti-LKM de type II chez les hépatites médicamenteuses.

Les échantillons négatifs ont une coloration verte sans fluorescence ou ne présente pas de fluorescence verte.

## **Limites / Réactions croisées**

1. Pas de réactions croisées connues.
2. MASTAFLUOR Combi 3 est très sensible et très spécifique, cependant les résultats doivent être interprétés en fonction des autres tests sérologiques, de l'historique clinique et autres aspects liés au patient afin de considérer le diagnostic comme significatif.

## **Performance**

Les variations inter et intra essais par rapport à l'intensité de fluorescence du contrôle ne sont pas détectables.

## **Références**

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



**Notizen / Notes / Note:**





**Notizen / Notes / Note:**

**Notizen / Notes / Note:**

**Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:**

**Explanations of abbreviations and icons used on labels:**

**Explications des abréviations et icônes sur les étiquettes:**

<b>SLIDES</b>	Objekträger	Slides	Films pour microplaque
<b>CONTR</b> +	Positive Kontrolle	Positive control	Contrôle positif
<b>CONTR</b> -	Negative Kontrolle	Negative control	Contrôle négatif
<b>CONJ</b>	FITC Konjugat	FITC-conjugate	FITC Conjugué
<b>BUFFER</b>	PBS Waschpuffer	PBS Washing buffer	PBS solution de lavage
<b>EVANS BLUE</b>	Evans Blau	Evans Blue	Bleu d'Evans
<b>MOUNTING MEDIUM</b>	Eindeckmedium	Mounting Medium	Milieu de montage
<b>LOT</b>	Charge	Batch	Lot
<b>REF</b>	Bestellnummer	Order code	Code
<b>AHG</b>	Anti-Human-Globulin	Anti-human globulin	Antoglobuline humaine
<b>RTU</b>	Gebrauchsfertig	Ready to use	Lot
	Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
	Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarques importantes
	Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption
	Lagerung bei	Storage	Conservation