

MONKEY STOMACH IFA SLIDES

For *in-vitro* diagnostic use

**Product Code: FS230.A
FS230.1**

Product manufactured by:
The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK
www.bindingsite.co.uk

Telephone: +44 (0)121 436 1000
Fax: +44 (0)121 430 7061
e-mail: info@bindingsite.co.uk



1 INTENDED USE

This product is intended for use in the screening and titration of circulating autoantibodies in human serum as an aid in the diagnosis and treatment of various autoimmune diseases. The two major autoantibodies detected are antigastric parietal cell (AGPCA) and antismooth muscle (ASMA).

2 SUMMARY AND EXPLANATION

Although the most commonly used substrate for detection of autoantibodies is rodent tissue, it can be argued that this is not ideal for diagnostic purposes. Some clinically significant autoantibodies bind poorly to rodent antigens and, conversely, heterophile antibodies bind to rodent tissues but are not clinically relevant (refs 2 and 3).

Monkey tissues are more similar to human tissues than rodent tissues with regard to both antigenic expression and organ structure. Unfortunately, monkey and human immunoglobulins are also very similar, sharing approximately 98% of their amino acid sequences. The background fluorescence, produced by staining of endogenous immunoglobulin, is therefore similar using either human or monkey tissues with conventional anti-human immunoglobulin conjugates. For this reason, The Binding Site's monkey adsorbed anti-human immunoglobulin FITC conjugates (FA003.M, FA004.M) are recommended for use with these slides. The absence of non-specific tissue staining, with these conjugates, enhances the sensitivity and facilitates interpretation.

Particular autoantibodies are associated with a number of different diseases. SMA are frequently associated with chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis, but are also detectable in low concentrations in various other conditions. GPC occur in the serum of most patients with pernicious anaemia

3 PRINCIPLE

These slides are used in an indirect immunofluorescence technique where patient samples and appropriate controls are incubated with the sections. The unreacted antibodies are washed off and then appropriate fluorescein- labelled conjugates are applied. Unbound conjugate is washed off as before. Slides are viewed with a fluorescence microscope and positive samples produce apple-green fluorescence that corresponds to areas of the section where autoantibody has bound (ref. 1).

4 REAGENTS

Monkey stomach sections on 5-well slides individually wrapped in a foil pouch containing a desiccant.

5 CAUTION

Proper handling and disposal methods should be established for all potentially infective samples tested with this product; only personnel adequately trained in such methods should be permitted to perform the procedures.

6 STORAGE AND STABILITY

Unopened slides should be stored at 2-8°C and can be used until the given expiry date. DO NOT FREEZE. Once slides are removed from a foil bag, they should be used immediately.

7 SPECIMEN COLLECTION

Blood samples should be collected by venepuncture, allowed to clot naturally and the serum separated as soon as possible to prevent haemolysis. The serum may be stored at 2-8°C for up to 7 days prior to assay (ref. 4), or for prolonged storage, aliquoted and stored at -20°C or below. DO NOT freeze and thaw sera more than once. Avoid using lipaemic, haemolysed or microbially contaminated sera as decreased titres or unclear staining patterns may occur.

8 METHODOLOGY

8.1 Materials provided

FS230.A, FS230.1

- 8.1.1 1 x *Monkey stomach*– 5 well slide or 10 x *Monkey Stomach 5 well slides* respectively.
- 8.1.2 1 x instruction leaflet.

8.2 Additional materials required

- 8.2.1 PBS for sample diluent and washes.
- 8.2.2 Container for PBS buffer.
- 8.2.3 Micropipettes and disposable tips to apply patient samples.
- 8.2.4 Humid chamber for incubation steps (e.g. magnetic staining chamber, Code BD010).
- 8.2.5 Fluorescence microscope with 495nm exciter filter and 515nm barrier filter.
- 8.2.6 Plastic squeeze bottle for initial wash in PBS.
- 8.2.7 Additional components may be obtained from The Binding Site: PBS (CON 3.3), negative control (CON 92), SMA positive control (FA134), GPC positive control (FA125), anti-Human IgG (H+L) monkey adsorbed conjugate (FA003.M), 1% Evan's Blue (CON 93) and Mounting medium (CON195).

8.3 Test Procedure

Quality Control

Positive and negative controls should be used every time samples are tested.

- 8.3.1 Mounting Medium: Remove the mounting medium from the fridge to allow it to reach room temperature (18°C-28°C) before it is needed.

8.3.2 Dilute Patient Samples

Screening: Dilute patient samples 1/20 by adding 10µL of serum to 190µL of PB buffer.

Titration: Make serial dilutions of positive screened samples with PBS buffer (e.g. 1/20, 1/40, 1/80 and 1/160 etc). For example: Take 100µL of the 1/20 dilution, mix with 100µL PBS to give a 1/40 dilution (repeat for further dilutions).

- 8.3.3 Substrate Slides. Allow substrate slide(s) to reach room temperature (18-28°C) prior to removal from pouch(es). Label slides appropriately, place in the humid chamber and add positive and negative controls to appropriate wells. Add 50µL of diluted patient samples to the remaining wells.

- 8.3.4 Slide Incubation. Incubate slides for 30 minutes in a humid chamber at room temperature (18-28°C).

- 8.3.5 PBS Wash. Remove slides from humid chamber and rinse briefly with PBS squeeze bottle. Do not squirt directly on to the wells. Place slides in a rack and immerse in PBS and agitate or stir for 5-10 minutes.

- 8.3.6 Addition of fluorescent conjugate. Shake off excess PBS and blot around wells. Return slides to humid chamber and immediately cover each well with a drop of appropriately diluted fluorescent conjugate. DO NOT LEAVE WELLS UNCOVERED FOR LONGER THAN 15 SECONDS. Drying out of the substrate seriously affects the results. The use of a monkey adsorbed conjugate will greatly enhance results (e.g. FA003.M).

- 8.3.7 Slide Incubation. Incubate slides for 30 minutes in humid chamber at room temperature (18-28°C), in the dark.

- 8.3.8 PBS Wash. Wash again as described in step 8.3.5. OPTIONAL COUNTERSTAIN. Add 2-3 drops of 1% Evans Blue per 100mL of PBS prior to slide immersion.

- 8.3.9 Mounting with coverslip. Remove one slide at a time from PBS wash. Quickly dry around the wells and add a drop of mounting medium to each well. Carefully lower the slide onto the coverslip, avoiding air

bubbles but, if present, do not attempt to remove. Wipe excess medium from around edge of coverslip.

- 8.3.10 View slides under fluorescence microscope. Slides may be stored for up to 3 days at 2-8°C, in the dark, without significant loss of fluorescence.

9 RESULTS

9.1 Quality Control

- 9.1.1 A serum sample containing SMA should give bright apple green fluorescent staining of the muscularis layers and interglandular fibres of the stomach.
- 9.1.2 A serum sample containing GPC should give bright apple green fluorescent staining of the parietal cells of the stomach.
- 9.1.3 A negative control should show dull green staining in all the tissue, with no discernible fluorescence.

If controls do not appear as described, the test is invalid and should be repeated.

9.2 Interpretation of Results

See references 2 and 3 for colour photographic examples of these patterns. Results are reported as positive or negative.

N.B: Each laboratory should establish at which point a positive result is considered clinically significant.

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

- 10.1 The light source, filters and optics of different makes of fluorescence microscopes will influence the sensitivity of the kit. The performance of the microscope is significantly influenced by correct maintenance especially centring of the mercury vapour lamp and changing of the lamp after the recommended period of time.
- 10.2 Suitability for use with other manufacturers' IFA reagents has not been assessed but use with such reagents should not necessarily be excluded.
- 10.3 This test alone should not be considered diagnostic. All other factors including the clinical history of the patient and other serological or biopsy results must also be taken into account.

11 REFERENCES

1. Weller T. H. & Coons A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
2. Bradwell A. R. *et al* (1997). Atlas of autoantibody patterns on tissues. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
3. Bradwell A. R. *et al* (1999). Advanced atlas of autoantibody patterns. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
4. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

12 SUMMARY OF PROCEDURE

- 12.1 Equilibrate mounting medium to room temperature.
- 12.2 Dilute PBS with distilled water.
- 12.3 Dilute patient sera 1/20 with PBS.
- 12.4 Equilibrate substrate slides to room temperature (18-28°C).
- 12.5 Apply 50-100µL positive and negative controls and diluted patient sera to appropriate wells.
- 12.6 Incubate in a humid chamber for 30 minutes.
- 12.7 Wash for 5-10 minutes in PBS.
- 12.8 Blot around each well and immediately cover each well with a drop of conjugate.
- 12.9 Incubate as in step 12.6.
- 12.10 Wash as step 12.7.
- 12.11 Mount.
- 12.12 View slide under fluorescence microscope.

AFFEN- MAGEN-OBJEKTTRÄGER FÜR DIE IFT

Zur *in vitro* Diagnostik

**Bestell-Nr.: FS230.A
FS230.1**

In England hergestellt von:

The Binding Site Ltd, P.O. Box 4073, Birmingham B29 6AT, United Kingdom. www.bindingsite.co.uk

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:

The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A
D-68723 Schwetzingen, Deutschland.

Telefon : +49 (0) 6202 92 62 0

Fax : +49 (0) 6202 92 62 222

e-mail: office@bindingsite.de



1 VERWENDUNGSZWECK

Dieses Produkt dient zum Nachweis und Titration zirkulierender Antikörper in Humanserum. Diese Autoantikörper sind wichtige Marker für die Diagnose und Therapie von verschiedenen Autoimmun-Erkrankungen.

Die häufigsten nachzuweisenden Autoantikörper sind: Antikörper gegen die glatte Muskulatur (ASMA) und Antikörper gegen Magen-Parietalzellen (GPA).

2 EINFÜHRUNG

Am häufigsten werden zum Nachweis dieser Autoantikörper Ratten- oder Maus-Gefrierschnitte verwendet, wobei man allerdings argumentieren kann, dass diese nicht das ideale Substrat für diagnostische Zwecke darstellen. Einige klinisch relevante Autoantikörper binden nur schlecht an die Ratten- bzw. Maus-Antigene und umgekehrt binden heterophile Antikörper an diese Gewebe und sind dabei nicht klinisch relevant (Ref. 2 und 3).

Die entsprechenden Affen-Gewebe sind dem humanen Gewebe hinsichtlich der Antigen-Expression und Organstruktur viel ähnlicher als Ratten- und Mausgewebe. Allerdings sind sich die Affen und Human-Immunglobuline sehr ähnlich - ca. 98% der Aminosäuresequenzen sind identisch. Die Hintergrundfluoreszenz, die durch Anfärbung von endogenen Immunglobulinen entsteht, zeigt bei Verwendung von herkömmlichen anti-human-immunglobulin-Konjugaten sowohl bei humanen als auch bei Affen-Gewebeschnitten eine vergleichbare Intensität. Daher wird für die Affen-Gefrierschnitte die Verwendung von affenadsorbierten anti-human-Immunglobulin-Konjugate (FA003.M, FA004.M) von The Binding Site empfohlen. Mit diesen Konjugaten tritt keine unspezifische Anfärbung auf, so dass die Sensitivität erhöht und die Interpretation erleichtert wird.

Einzelne Autoantikörper sind mit einer Anzahl von verschiedenen Erkrankungen assoziiert. ASMA's sind mit der chronischen aktiven Hepatitis und der primären biliären Zirrhose assoziiert, sind aber in niedrigeren Konzentrationen auch bei anderen Erkrankungen nachweisbar. GPA's werden bei Patienten mit perniziöser Anämie gefunden.

3 TESTPRINZIP

Der Test beruht auf der indirekten Immunfluoreszenz-Technik. Die Patientenserum und entsprechende Kontrollen werden auf den Gefrierschnitten inkubiert. In einem Waschschriff werden die nicht reagierenden Antikörper entfernt und dann das Fluoreszenzkonjugat zugegeben. Überschüssiges Konjugat wird durch Waschen entfernt. Die Beurteilung der Objektträger erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Positive Patientenserum zeigen im Bereich der Bindungsstellen zwischen dem Gewebe und den Autoantikörpern eine apfelgrüne Fluoreszenz (Ref. 1).

4 REAGENZIEN

Affen-Magen-Gefrierschnitte sind auf Objektträger mit je 5 Auftragsstellen aufgebracht. Die Objektträger sind einzeln in Folienbeuteln, die ein Trockenmittel enthalten, verpackt.

5 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Die zu untersuchenden Patientenserum sollten als potentiell infektiös angesehen werden - entsprechende Umgangs- und Entsorgungsmethoden beachten. Der Test sollte nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Unbenutzte Objektträger bei 2-8°C lagern, sie sind so bis zum angegebenen Datum verwendbar. NICHT EINFRIEREN! Nach dem Öffnen der Folienbeutel sollten die Objektträger sofort verwendet werden.

7 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Blutproben über Venenpunktur sammeln und bei Raumtemperatur gerinnen lassen. Das Serum so schnell wie möglich vom Gerinnsel abtrennen um eine Hämolyse zu vermeiden. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 7 Tage vor dem Test gelagert werden (Ref. 4). Für eine längere Lagerung empfiehlt es sich, die Seren aliquotiert bei mindestens -20°C einzufrieren. Serum nur einmal einfrieren und auftauen. Keine stark lipämische, hämolytische oder mikrobiell verunreinigte Seren verwenden, da dadurch erniedrigte Titer oder unklare Muster auftreten können.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 Gelieferte Materialien

FS230.A, FS230.1

8.1 *Monkey stomach* – 1x5 well slide oder 10 x *Monkey stomach* – 5 well slides (1 x 5 Felder Affen-Magen-Objektträger (FS230.A) oder 10 x 5 Felder Affen-Magen-Objektträger (FS230.1)).

8.1.2 1 x Arbeitsanleitung.

8.2 Benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

8.2.1 PBS-Puffer zum Verdünnen der Patientenseren und zum Waschen.

8.2.2 Gefäß für PBS-Puffer.

8.2.3 Mikropipetten und Einmal-Spitzen zum Pipettieren von Patientenseren.

8.2.4 Feuchte Kammer für die Inkubationen (z.B. Magnetische Färbe-kammer, Bestell-Nr.: BD010).

8.2.5 Fluoreszenzmikroskop mit einem 495 nm Anregungsfilter und 515 nm Barrierefilter.

8.2.6 Spritzflasche für 1. Waschschrift.

8.2.7 Zusätzlich benötigte Komponenten können bei The Binding Site bestellt werden: PBS-Puffer (Bestell-Nr.: CON3.3), Negativkontrolle (Bestell-Nr.: CON92), ASMA Positiv-Kontrollserum (Bestell-Nr.: FA134), GPA Positiv-Kontrollserum (Bestell-Nr.: FA125), Anti-Hu-IgG-(H+L)-AFF-FITC-Konjugat (affennadsorbiert) (Bestell-Nr.:FA003.M), 1%ige Evans-Blue-Lösung (Bestell-Nr.: CON93) und Eindeckmedium (Bestell-Nr.: CON195).

8.3 Testdurchführung

Qualitätskontrolle

Die Negativ- und Positivkontrollen sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden.

Eindeckmedium

8.3.1 Eindeckmedium aus dem Kühlschrank nehmen und vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen.

Patientenseren verdünnen

Screening: Patientenseren im Verhältnis 1/20 verdünnen. (z.B. 10µl Serum + 190µl PBS-Puffer)

Titration: Von im Screening positiven Proben eine serielle Verdünnungsreihe erstellen (z. B. 1/20, 1/40; 1/80; 1/160 usw.). z. B. 100µl eines 1/20 verdünnten Patientenserums mit 100µl PBS-Puffer versetzen - ergibt eine 1/40 Verdünnung.

8.3.3 Objektträger vorbereiten Die Objektträger auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen. Folienbeutel erst direkt vor dem Gebrauch öffnen! Die Objektträger aus dem Folienbeutel nehmen, entsprechend beschriften und in eine feuchte Kammer geben. Positiv- und Negativkontrollen und je 50 - 100µL der verdünnten Patientenseren auf die jeweiligen Auftragsstellen pipettieren.

8.3.4 Inkubation der Objektträger Die Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur (18-28°C) in der feuchten Kammer inkubieren.

8.3.5 Waschen mit PBS-Puffer Die Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen und rasch mit PBS-Puffer (Spritzflasche) waschen, dabei nicht direkt in die Auftragsfelder spritzen. Die Objektträger in eine Halterung geben und in ein PBS-Pufferbad eintauchen. Die Objektträger 5-10 min. im PBS-Puffer belassen, dabei rühren oder leicht schütteln.

8.3.6 Zugabe von Fluoreszenz-Konjugat Überschüssigen PBS-Puffer abschütten und die Objektträger um die Auftragsstellen herum gut abtrocknen. Die Objektträger wieder in die feuchte Kammer legen und sofort, D. H. INNERHALB VON 15 SEC, auf jede Auftragsstelle einen Tropfen Fluoreszenz-Konjugat, das entsprechend der Angaben verdünnt wurde, geben. Das Austrocknen des Substrats kann das Ergebnis beträchtlich beeinträchtigen.

Die Verwendung des affennadsorbierten FITC-Konjugats (z.B. FA003.M) verbessert die Ergebnisse erheblich.

8.3.7 Inkubation der Objektträger Die Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur (18°C - 28°C) in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren.

8.3.8 Waschen mit PBS-Puffer Erneut waschen wie unter Punkt 8.3.5 beschrieben. Wenn eine Gegenfärbung gewünscht wird, können bei diesem Waschschrift bis zu 5 Tropfen einer 1 %igen Evans-Blue-Lösung pro 100 mL PBS-Puffer zugegeben werden.

8.3.9 Deckgläschen aufsetzen Jeweils nur einen Objektträger aus dem PBS-Pufferbad nehmen. Um die Auftragsstellen herum rasch abtrocknen und jeweils 1 Tropfen Eindeckmedium auf die Auftragsstellen geben. Das Deckgläschen sorgfältig auf den Objektträger legen, wobei Luftbläschen zu vermeiden sind. Eventuell vorhandene Luftblasen nicht versuchen zu entfernen. Überschüssiges Eindeckmedium mit Filterpapier entfernen.

8.3.10 Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Sie können im Dunkeln bei 2-8°C bis zu drei Tage ohne signifikanten Fluoreszenzverlust aufbewahrt werden.

9 ERGEBNISSE

9.1 Qualitätskontrolle

9.1.1 Ein Serum, das ASMA's enthält, sollte eine kräftige, apfelgrüne Fluoreszenzfärbung der Muskelschichten und der interglandulären Fasern im Magen erzeugen.

9.1.2 Ein Serum, das GPA's enthält, sollte eine kräftige, apfelgrüne Fluoreszenzfärbung der Magen-Parietalzellen erzeugen.

9.1.3 Die Negativkontrolle zeigt eine matt-grüne Anfärbung des Gewebes ohne erkennbare Fluoreszenz

Erscheint eine der Kontrollen nicht wie beschrieben, sollte der Testansatz verworfen und ein neuer Ansatz gemacht werden.

9.2 Interpretation der Ergebnisse

Farbfotos mit typischem Fluoreszenzmuster siehe Ref. 2 und 3. Die Ergebnisse sollten als positiv oder negativ ausgegeben werden.

Hinweis: Jedes Labor sollte eigene Richtlinien erstellen und festlegen wann ein positives Ergebnis klinisch relevant ist.

10 GRENZEN DES TESTS

10.1 Die im Fluoreszenzmikroskop verwendete Lichtquelle, Filter und Optik beeinflussen die Sensitivität des Tests. Die Qualität des Mikroskops wird maßgeblich durch die korrekte Wartung, speziell durch Zentrieren der Quecksilberlampe und deren Austausch nach der empfohlenen Brenndauer, beeinflusst.

10.2 Die Verwendung dieser Produkte mit IFT-Reagenzien anderer Hersteller wurde nicht überprüft, ist aber nicht zwangsläufig ausgeschlossen.

10.3 Der Test allein ist nicht als diagnostischer Beweis ausreichend. Alle Ergebnisse sollten immer nur im Zusammenhang mit anderen Laborbefunden (Serologie, Biopsie) und dem klinischen Bild des Patienten betrachtet werden.

11 REFERENZEN

1. Weller T. H. & Coons A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
2. Bradwell A. R. *et al* (1997). Atlas of autoantibody patterns on tissues. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
3. Bradwell A. R. *et al* (1999). Advanced atlas of autoantibody patterns. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
4. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

12 KURZANLEITUNG

- 12.1 Eindeckmedium auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
- 12.2 PBS-Pufferkonzentrat mit destilliertem Wasser verdünnen.
- 12.3 Patientenseren 1 / 20 mit PBS-Puffer verdünnen.
- 12.4 Objektträger auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen.
- 12.5 Je 50 - 100µL Kontrollen und Patientenseren auftragen.
- 12.6 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-28°C) in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 12.7 Objektträger 5-10 min. mit PBS-Puffer waschen.
- 12.8 Objektträger aus dem PBS-Bad nehmen, um die Auftragsstellen herum gut abtrocknen, wieder in die feuchte Kammer legen und sofort je einen Tropfen FITC-Konjugat auf jede Auftragsstelle auftropfen.
- 12.9 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- 12.10 Wie unter Punkt 12.6 beschrieben waschen.
- 12.11 Objektträger Eindecken und Deckgläschen aufsetzen.
- 12.12 Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten.

LAMES D'IMMUNO-FLUORESCENCE D'ESTOMAC DE SINGE

Pour un usage en diagnostic *in vitro*

Références : FS230.A
FS230.1

Produits fabriqués en Angleterre par la société :
The Binding Site Ltd, PO Box 4073, Birmingham B29 6AT,
United Kingdom. www.bindingsite.co.uk

Distribués en France par la société :
The Binding Site, 14 rue des Glairaux, BP226, 38522 Saint-Egrève Cedex.

Téléphone : 04.38.02.19.19
Fax : 04.38.02.19.20
e-mail : info@bindingsite.fr



1 INDICATIONS

Ces lames sont destinées au dépistage et au titrage des auto-anticorps circulants dans le sérum humain. Elles apportent une aide au diagnostic et au traitement de plusieurs maladies auto-immunes. Les deux principaux auto-anticorps détectés sont les anti-muscle lisse (ASMA) et les anti-cellules pariétales gastriques (AGPCA).

2 RESUME ET EXPLICATIONS

Bien que le substrat communément utilisé pour la détection des anticorps anti-tissu soit le tissu de rongeur, il ne semble pas idéal pour le diagnostic. Certains auto-anticorps significatifs du point de vue clinique se lient faiblement aux antigènes de rongeurs et au contraire des anticorps hétérophiles se lient aux tissus de rongeurs mais n'ont pas de signification clinique (réfs 2 et 3).

Les tissus de singe sont plus proches des tissus humains que les tissus de rongeurs tant par leur expression antigénique que par la structure de l'organe. Malheureusement, les immunoglobulines de singe et humaines sont également très proches partageant 98% de leur séquence en acides aminés. Le bruit de fond produit par le marquage des immunoglobulines endogènes est le même en utilisant du tissu humain ou du tissu de singe avec un conjugué anti-humain classique. Pour cette raison, il est recommandé d'utiliser les conjugués FITC anti-immunoglobulines humaines spécialement conçus pour les tissus de singe (réf. FA003.M ou réf. FA004.M) car l'absence de marquage tissulaire non spécifique augmente la sensibilité et facilite l'interprétation.

Des auto-anticorps particuliers sont associés avec différentes maladies. Les SMA sont fréquemment associés à l'hépatite chronique active et la cirrhose biliaire primitive mais ils sont également détectables en faibles concentrations dans d'autres maladies. Les GPC sont trouvés dans le sérum de la plupart des patients atteints d'anémie pernicieuse.

3 PRINCIPE

Ces lames sont utilisées en immunofluorescence indirecte. Les sérums de patients sont incubés sur les coupes. Les anticorps non fixés sont éliminés par lavage. Un marquage fluorescent permet de révéler les auto-anticorps spécifiques. La lecture des lames s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. La positivité des échantillons se traduit par un marquage fluorescent de certaines régions de la coupe sur lesquelles sont accrochés les auto-anticorps (réf. 1).

4 REACTIFS

Lames de 5 puits d'estomac de singe emballées individuellement dans un sachet aluminium contenant un dessiccateur.

5 PRECAUTIONS

Les échantillons testés pouvant être infectés, il est nécessaire de les manipuler avec précaution. Seul un personnel formé est autorisé à utiliser ce réactif.

6 STOCKAGE ET STABILITE

Les lames non ouvertes doivent être stockées à 2-8°C et peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption. NE PAS CONGELER. Lorsque les lames sont sorties de leurs étuis, les utiliser immédiatement.

7 ECHANTILLONS

Prélever de façon stérile et par ponction veineuse un échantillon de sang. Laisser le sang coaguler à température ambiante, puis séparer le sérum du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les sérums peuvent être conservés à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests (réf. 4) ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue. Ne pas congeler et décongeler les sérums plus d'une fois. Il est recommandé d'utiliser des sérums non lipidiques, non hémolysés et non contaminés par des bactéries qui induiraient des titres faibles ou des aspects de marquage non clairs.

8 METHODOLOGIE

8.1 Matériel fourni

FS230.A, FS230.1

8.1.1 1 x *Monkey stomach*– 5 well slide (1 lame de 5 puits) ou 10 x *Monkey stomach*– 5 well slide (10 lames de 5 puits d'estomac de singe, respectivement).

8.1.2 1 fiche technique.

8.2 Matériel nécessaire et non fourni

8.2.1 Tampon PBS comme diluant des échantillons et pour les lavages.

8.2.2 Récipient pour le tampon PBS.

8.2.3 Micro-pipettes et cônes pour le dépôt des échantillons.

8.2.4 Chambre humide pour les étapes d'incubation (ex : Chambre de marquage magnétique Binding Site Réf. BD010).

8.2.5 Microscope à fluorescence avec un filtre excitant à 495nm et un filtre barrière à 515nm.

8.2.6 Flacon plastique pour le lavage initial en PBS.

8.2.7 D'autres réactifs peuvent être obtenus chez Binding Site : tampon PBS (CON 3.3), contrôle négatif (CON 92), contrôle positif ASMA (FA134), contrôle positif AGPCA (FA125), conjugué AFF FITC anti-IgG (H+L) humaines adsorbé sur singe (FA003.M), bleu d'Evans à 1% (CON 93) et milieu de montage (CON195).

8.3 Procédure

Contrôle qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés à chaque série de tests.

8.3.1 Milieu de montage

Sortir le milieu de montage du réfrigérateur et le ramener à température ambiante (18-28°C) avant utilisation.

8.3.2 Dilution des échantillons

Dépistage: Diluer les échantillons au 1/20 en ajoutant 10µL de sérum à 190µL de tampon PBS.

Titration: Faire une série de dilutions en tampon PBS sur les échantillons dépistés positifs (1/20, 1/40, 1/80 et 1/16).

Par exemple: prendre 100µL de la dilution au 1/20 et mélanger avec 100µL de tampon PBS pour donner une dilution au 1/40 (Répéter pour les dilutions suivantes).

8.3.3 **Lames.** Les ramener à température ambiante (18-28°C) avant de les sortir de leur emballage. Les marquer puis les déposer dans une chambre humide. Déposer immédiatement 50-100µL de contrôles ou de sérum de patient dilué au 1/20.

8.3.4 **Incubation des lames.** Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C).

8.3.5 **Lavage.** Sortir les lames de la chambre humide et les rincer rapidement à l'aide d'une pissette contenant du tampon PBS. Ne pas diriger le jet directement sur les puits. Mettre les lames sur un portoir et les immerger en PBS sous agitation lente pendant 5 à 10 minutes.

8.3.6 **Conjugué fluorescent.** Eliminer l'excès de PBS et sécher le pourtour des puits à l'aide de buvards ou de papier absorbant. Remettre les lames en chambre humide et couvrir **immédiatement** chaque puits avec une goutte de conjugué IgG (H+L) AFF FITC. NE PAS LAISSER LES PUIITS A L'AIR PENDANT PLUS DE 15 SECONDES. L'utilisation du conjugué spécial tissus de singe (FA003.M) permet d'obtenir de meilleurs résultats.

8.3.7 **Incubation des lames.** Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C) dans l'obscurité.

8.3.8 **Lavage.** Procéder comme à la section 8.3.5. Il est possible de contre-colorer les lames en ajoutant 2 à 3 gouttes de Bleu d'Evans à 1% pour 100 ml de PBS avant immersion des lames.

- 8.3.9 Montage des lames. Sortir les lames une à une du PBS. Sécher rapidement le pourtour des puits puis déposer une goutte de milieu de montage dans chaque puits. Déposer la lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Ne pas essayer d'éliminer les bulles d'air éventuellement apparues. Essuyer l'excès de milieu de montage.
- 8.3.10 Lecture des lames. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les lames peuvent être stockées pendant 3 jours à 2-8°C à l'obscurité sans diminution de l'intensité de fluorescence.

9 RESULTATS

9.1 Contrôle qualité

- 9.1.1 Un échantillon contenant des ASMA doit donner un marquage vert fluorescent des couches musculaires et des fibres inter-glandulaires de l'estomac.
- 9.1.2 Un sérum contenant un anti-GPC présente un marquage vert uniquement sur les cellules pariétales de l'estomac.
- 9.1.3 Un contrôle négatif doit donner un marquage vert pâle dans tous les tissus sans fluorescence discernable.

Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrits ci-dessus, le test est invalide et doit être répété.

9.2 Interprétation des résultats

Cf. références 2 et 3 pour les photographies en couleur de cet aspect. Les résultats sont rendus comme négatifs ou positifs.

N.B: Chaque laboratoire doit établir le seuil de positivité à partir duquel il y a signification clinique.

10 LIMITES DE LA PROCEDURE

- 10.1 La qualité des filtres, des optiques et de la source lumineuse peut influencer la sensibilité du test. Les performances du microscope sont affectées par le centrage et le changement de la lampe.
- 10.2 L'utilisation de réactifs pour immunofluorescence provenant d'autres fournisseurs n'ont pas été testés mais elle n'est pas impossible.
- 10.3 Les aspects positifs des auto-anticorps n'apportent qu'une aide au diagnostic et ne constituent pas un diagnostic en soi. Les résultats du test doivent tenir compte des autres résultats du laboratoire et du suivi clinique du patient.

11 REFERENCES

- Weller T. H. & Coons A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
- Bradwell A. R. *et al* (1997). Atlas of autoantibody patterns on tissues. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
- Bradwell A. R. *et al* (1999). Advanced atlas of autoantibody patterns. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
- Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

12 RESUME DE LA PROCEDURE

- Ramener le milieu de montage à température ambiante.
- Diluer le PBS dans de l'eau distillée.
- Diluer les sérums au 1/20 dans du PBS.
- Ramener les lames à température ambiante (18-28°C).
- Déposer 50 à 100µL de contrôles positifs et négatifs et les sérums de patients dilués dans les puits.
- Incuber 30 minutes en chambre humide.
- Laver 5 à 10 minutes en tampon PBS.
- Sécher autour des puits et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué.
- Incuber comme à l'étape 12.6.
- Laver comme à l'étape 12.7.
- Monter les lames.
- Visualiser sous un microscope à fluorescence.

PORTAOBJETOS PARA INMUNOFLORESCIENCIA- SECCIONES DE ESTÓMAGO DE MONO

Para uso diagnóstico *in vitro*

Código Producto: **FS230.A,**
FS230.1

Producido por:

The Binding Site Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site sucursal en España,
C/ Balmes 243 4º 3ª, 08006 Barcelona

Teléfono 902027750

Fax: 902027752

e-mail: info@bindingsite.es



web: www.bindingsite.es

1 INDICACIONES

Este producto se utiliza para el screening y la titulación de los autoanticuerpos circulantes en el suero humano como auxiliar en el diagnóstico y en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes. Los dos autoanticuerpos principales determinados son los anti-musculatura lisa (ASMA) y los anti-células parietales gástricas (AGPCA).

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El tejido de roedor es el tipo de sustrato más normalmente utilizado para la determinación de los autoanticuerpos. Sin embargo, el uso de este tejido con fines diagnósticos es opinable. Algunos anticuerpos clínicamente significativos se unen de manera débil a los antígenos de roedor. Viceversa los anticuerpos heterófilos se unen a los tejidos de roedores, pero sin ninguna relevancia clínica (ref. 2 y 3).

Los tejidos de mono son más similares a aquellos humanos respecto a los tejidos de roedor, tanto en la expresión antigénica como en la estructura de los órganos. Lamentablemente también las inmunoglobulinas de mono son muy similares a aquellas humanas, con cerca del 98% de la secuencia aminoacídica en común. La fluorescencia de fondo causada por la coloración de inmunoglobulinas endógenas es por tanto similar utilizando tanto los tejidos humanos como los de mono, con los conjugados de anti-inmunoglobulinas humanas normalmente utilizados. Por eso se recomienda el uso de estos portaobjetos juntamente con los conjugados The Binding Site de anti-inmunoglobulinas humanas FITC adsorbidos con tejidos de mono (FA003.M, FA004.M). La ausencia de coloración tisular no específica con tales conjugados aumenta la sensibilidad y facilita la interpretación.

Determinados autoanticuerpos se asocian a diferentes patologías. Los SMA se asocian de manera frecuente a la hepatitis crónica activa y la cirrosis biliar primitiva, pero se identifican también a bajas concentraciones en otras diferentes condiciones. Los GPC están presentes en el suero de la mayoría de los pacientes afectados por anemia perniciosa.

3 PRINCIPIO

Se utiliza una técnica de inmunofluorescencia indirecta, en la que las muestras de los pacientes y los controles adecuados se incuban en los portaobjetos con las secciones. Los anticuerpos no específicos se eliminan mediante lavado y, a continuación, se aplican conjugados marcados con fluoresceína. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, tal como se ha hecho anteriormente. Los portaobjetos se examinan en un microscopio de fluorescencia. Las muestras positivas producen una fluorescencia de color verde que corresponde a las áreas de la sección en las que se ha unido el autoanticuerpo (ref. 1).

4 REACTIVOS

Secciones de estómago de mono en portaobjetos de 5 pocillos envueltos individualmente en una bolsa con agente desecante.

5 PRECAUCIONES

Deben establecerse métodos de manipulación y eliminación adecuados para todos los materiales potencialmente infecciosos y los procedimientos deben permitirse sólo a personal experto y autorizado.

6 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los portaobjetos no abiertos deben conservarse a 2-8°C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada. NO CONGELE. Una vez extraídos los portaobjetos de la bolsa deben utilizarse inmediatamente.

7 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre deben proceder de extracciones venosas, dejadas coagular naturalmente. Separe el suero lo más rápidamente posible para evitar la hemólisis. El suero puede conservarse a 2-8°C durante un máximo de 7 días antes del ensayo (ref. 4), o para periodos más largos, distribuir el suero en alícuotas y conservarlo a -20°C, o temperatura inferior. NO congele y descongele los sueros más de una vez. Evite el uso de sueros lipémicos, hemolizados o contaminados por microbios, puesto que puede dar lugar a títulos más bajos o patrones de coloración poco claros.

8 METODOLOGÍA

8.1 Materiales suministrados

FS230.1, FS230.A

- 8.1.1 10 x *Monkey stomach - 5-well-slide*; (10x portaobjetos de 5 pocillos con estómago de mono) o 1 x *Monkey stomach - 5-well-slide*; (1x portaobjeto de 5 pocillos con estómago de mono), respectivamente.
- 8.1.2 1 ficha técnica.

8.2 Material necesario no suministrado

- 8.2.1 PBS para dilución de muestras y lavados.
- 8.2.2 Recipiente para el PBS.
- 8.2.3 Micropipetas y puntas desechables para dispensar las muestras de los pacientes.
- 8.2.4 Cámara húmeda para las fases de incubación (ej. Cámara de tinción magnética, código BD010).
- 8.2.5 Microscopio de fluorescencia con un filtro a 495 nm (exciter) y un filtro a 515 nm (barrier).
- 8.2.6 Botella comprimible de plástico para lavado inicial en PBS.
- 8.2.7 Pueden adquirirse los siguientes componentes adicionales a The Binding Site: PBS (CON 3.3), control negativo (CON 92), control positivo SMA (FA134), control positivo GPC (FA125), conjugado anti-IgG humanas (H&L) AFF FITC adsorbido con tejido de mono (FA003.M), solución de montaje (CON195) y solución Azul de Evans al 1% (CON 93).

8.3 Procedimiento

Control de Calidad

Deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se ensayen las muestras.

- 8.3.1 Solución de montaje: Saque la solución de montaje del refrigerador para que alcance la temperatura ambiente (18-28 °C) antes de su uso.
- 8.3.2 Dilución de muestras de los pacientes.
Screening: Diluya las muestras 1/20 añadiendo 10µl de suero a 190µl de PBS.
Titulación: Realice diluciones seriadas de las muestras positivas con PBS (ej. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 etc.). Por ejemplo: tome 100µL de la dilución 1/20 y diluya con 100µL de PBS para obtener una dilución 1/40. Repita el procedimiento para otras diluciones.
- 8.3.3 Portaobjetos con substrato. Deje que los portaobjetos alcancen la temperatura ambiente (18-28 °C) antes de sacarlos de la bolsa. Etiquete los portaobjetos correctamente, les coloque en la cámara húmeda y añada el control positivo y negativo en los respectivos pocillos. Añada 50µL de las muestras diluidas en los pocillos restantes.
- 8.3.4 Incubación de portaobjetos. Incube los portaobjetos durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28 °C).
- 8.3.5 Lavado con PBS. Saque los portaobjetos de la cámara húmeda y los aclare brevemente con el PBS en una botella comprimible de plástico. No dirija directamente el chorro a los pocillos. Coloque los portaobjetos en un rack, les sumerja en el PBS, después agite durante 5-10 minutos.
- 8.3.6 Añadición de conjugado fluorescente. Elimine el exceso de PBS y seque el contorno de los pocillos con papeles absorbentes suministrados. Vuelva a colocar los portaobjetos en la cámara húmeda y cubra inmediatamente cada pocillo con una gota de conjugado fluorescente diluido. NO DEJE LOS POCILLOS DESCUBIERTOS DURANTE MÁS DE 15 SEGUNDOS. El secado del substrato afecta negativamente a los resultados. La utilización de

conjugado adsorbido con tejido de mono permitirá obtener mejores resultados (ej. FA003.M).

- 8.3.7 Incubación de portaobjetos. Incube los portaobjetos durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28 °C) a oscuras.
- 8.3.8 Lavado con PBS. Vuelva a lavar y secar, tal como se describe en el paso 8.3.5. **COLORACIÓN DE CONTRASTE OPCIONAL**. Añada 2-3 gotas de azul de Evans al 1% por cada 100 ml de PBS antes de proceder a la inmersión de los portaobjetos.
- 8.3.9 Montaje con cubreobjetos. Quite uno a uno los portaobjetos de la solución PBS de lavado. Seque rápidamente el contorno de los pocillos y añada una gota de solución de montaje en cada pocillo. Coloque con cuidado el portaobjeto en el cubreobjeto, evitando que se formen burbujas de aire, pero sin intentar eliminar las que se hayan formado. Elimine el exceso de solución de montaje del contorno del cubreobjeto.
- 8.3.10 Examen de portaobjetos con el microscopio de fluorescencia. Los portaobjetos pueden conservarse a 2-8°C a oscuras durante un máximo de 3 días, sin una significativa pérdida de fluorescencia.

9 RESULTADOS

9.1 Control de Calidad

- 9.1.1 Una muestra de suero con SMA debe mostrar una fluorescencia color verde brillante de las capas musculares y fibras interglandulares del estómago.
- 9.1.2 Una muestra de suero con GPC debe mostrar una fluorescencia color verde brillante de las células parietales del estómago.
- 9.1.3 El control negativo debe mostrar una coloración verde oscura en todos los tejidos, sin fluorescencia visible.

Si los controles no resultan tal como se describe arriba, el ensayo debe considerarse no válido y, por consiguiente, deberá repetirse.

9.2 Interpretaciones de los Resultados

Véase las referencias 2 y 3 para un ejemplo de imágenes en color de este patrón. Los resultados se notifican como positivos o negativos.

N.B.: cada laboratorio debe establecer el valor límite en el que se considera que un resultado positivo es clínicamente significativo.

10 LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

- 10.1 Este ensayo por sí solo no es válido para el diagnóstico. También deben tenerse en cuenta los demás factores, incluidos la historia clínica de los pacientes y otros resultados serológicos o biopsicos.
- 10.2 No se ha evaluado la idoneidad del uso con reactivos IFA de otros fabricantes, sin embargo, no debe excluirse su empleo.
- 10.3 La fuente de luz, los filtros y la óptica de los microscopios de fluorescencia de diferentes marcas influirán en la sensibilidad del kit. El funcionamiento del microscopio depende en gran medida de un correcto mantenimiento, especialmente del enfoque y reemplazo de la lámpara de vapor de mercurio después el período de tiempo recomendado.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Weller T. H. & Coons A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
- Bradwell A. R. *et al* (1997). Atlas of autoantibody patterns on tissues. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
- Bradwell A. R. *et al* (1999). Advanced atlas of autoantibody patterns. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
- Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

12 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

- Deje que la solución de montaje alcance la temperatura ambiente.
- Diluya el PBS con agua destilada.
- Diluya los sueros de los pacientes en 1/20 con PBS.
- Deje que los portaobjetos alcancen la temperatura ambiente (18-28 °C).
- Dispense 50-100µL de los controles positivos y negativos y sueros de pacientes diluidos en los respectivos pocillos.
- Incube en una cámara húmeda durante 30 minutos.
- Lave durante 5-10 minutos en PBS.
- Seque el contorno de cada pocillo y cubra inmediatamente cada pocillo con una gota de conjugado.
- Incube como en la fase 12.6 en lugar oscuro.
- Lave como en la fase 12.7 y seque.
- Monte.
- Examine el portaobjeto con el microscopio de fluorescencia.