



HISTOFLUOR[®] ANTI-ENDOMYSIUM AUTOANTIKROPP (EmA) FLUORESCERANDE TESTSYSTEM

För diagnostisk användning in vitro

Endast för export

För yrkesmässig användning

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett indirekt fluorescerande antikroppstest för kvalitativ och halvkvantitativ detektering av antikroppar mot endomysium i humanserum. Detta testsystem skall användas som hjälp vid detektering av antikroppar som förknippas med celiaki och dermatit herpetiformis.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

De autoantikroppar som finns i människor är riktade mot ett antal olika antigener. Många av dessa antigener är mycket konserverade, så att praktiskt taget identiska antigena epitoper hittas i djur- och människovävnad. Användningen av djurvävnad för att detektera dessa antikroppar är ett sedan länge använt laboratorieförfarande. Många av de autoantikroppar som detekteras på djurvävnad är nära förknippade med specifika autoimmuna sjukdomar hos människor. Detektering och kvantifiering av specifika autoantikroppar möjliggör diagnos och övervakning av specifika autoimmuna sjukdomar (1).

TESTPRINCIP

Immuno Concepts fluorescerande antikroppstestsystem använder den indirekta fluorescerande antikroppsteknik som först beskrevs av Weller och Coons (2). Patientprover inkuberas med antigensubstrat för att tillåta specifik bindning av autoantikroppar till cellkomponenter. Om autoantikroppar förekommer bildas ett stabilt antigen/antikroppkomplex. Efter tvättning för att avlägsna icke-specifika och obundna antikroppar, inkuberas substratet med en antihuman antikropp som konjugeras till fluorescein. När resultaten är positiva bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av fluorescerande antikropp bunden till human autoantikropp, som binds till cellulärt antigen. Detta komplex kan visualiseras med hjälp av ett fluorescerande mikroskop. I positiva prover uppvisar cellerna en äppelgrön fluorescens med ett färgningsmönster som är karakteristiskt för den aktuella antigenfördelningen inom cellerna. Om provet är negativt för autoantikroppar uppvisar cellerna inte ett tydligt urskiljbart fluorescensmönster.

SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM INGÅR

Användning: Alla komponenter levereras klara för användning utan behov av alikvotering eller rekonstitution (förutom PBS-bufferten som måste upplösas i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

Förvaring: Alla komponenter kan förvaras i kylskåp vid 2-10 °C. Efter rekonstitution skall PBS-bufferten förvaras i behållare med skruvlock vid 2-25 °C. Monteringsmedel och skyddsremsor kan lagras vid rumstemperatur (18-25 °C).

Stabilitet: Alla komponenter förblir stabila i minst 12 månader från tillverkningsdatum. Använd inte någon komponent senare än dess förfallodatum.

REAKTIVA REAGENSER

Substratobjektglas **OBJEKTGLAS**: Katalognr 12004-01, 12008-01. Tunna (ungefär 4-5 mikrometer) snitt av primats distala esofagus.

Specifik positiv kontroll för antikroppar mot endomysium **KONTROLL +**: Katalognr 12021-01. Pipettampull redo för användning innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp specifik för endomysiumantigener. Detta serum påvisar ett positivt färgningsmönster för antikroppar mot endomysium på primatvävnadssubstratet.

Negativt kontrollserum **KONTROLL -**: Katalognr 12031. Pipettampull redo för användning innehållande 1,0 ml negativt humankontrollserum. Denna kontroll kan påvisa svagt fluorescerande färgning, men den visar inget urskiljbart mönster.

Fluorescerande antikroppsreagens **CONJFITC**: Katalognr 12009-01 (9,0 ml), 12075-01 (23 ml). Get anti-humant IgA konjugerat med fluorescein isotiocyanat (FITC). Reagensen levereras redo för användning i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart 10:e objektglas i fullständiga testsatser.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

PBS-buffertpulver **PWDRIPBS**: Katalognr 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge 1 liter. (En påse med buffertpulver levereras för vart femte objektglas i fullständiga testsatser.)

Framställning: Lös upp en påse med buffertpulver i 1 liter avjoniserat eller destillerat vatten, täck och förvara mellan 2 och 25 °C under upp till fyra veckor eller tills tecken på förorening eller andra synliga förändringar uppträder.

Halvpermanent monteringsmedel **SOLNIMM**: Katalognr 1111. Bruksfärdig pipettampull innehållande 5,0 ml glycerolbaserat monteringsmedel. Denna reagens kan lagras vid rumstemperatur (18-25 °C).

Skyddsremсор **CVSLP**: Katalognr 1042. Varje bunt innehåller tio (10) 24x64 mm skyddsremсор av glas nr 1. Skyddsremсор kan lagras i rumstemperatur (18-25 °C).

YTTERLIGARE MATERIAL SOM KRÄVS - MEN INTE INGÅR

Volymetriska pipetter för pipettering av 30-40 µl volymer
Coplin-kärl eller färgningsskålar
Klämflaska eller Pasteur-pipetter
Serologiska pipetter
Enlitersbehållare (för PBS-buffert)
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att framställa serumspädningar
Läskpapper eller pappershanddukar
Inkubationskammare
Engångshandskar
Laboratorietidur
Fluorescerande mikroskop med 495 nm matarfilter och 515 nm spärrfilter

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av humant ursprung som använts för denna produkt har testats och visat sig vara negativt (inte upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunbristvirus-1 (HIV-1), humant immunbristvirus-2 (HIV-2), hepatit C-virus (HCV) och hepatit B ytantigen (HBsAg) med FDA-godkända metoder. Ingen testmetod kan emellertid helt garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit C-virus, hepatit B eller andra smittämnen. Därför skall allt satsmaterial hanteras som potentiellt smittsamt material. Allt material som härstammar från djur som används för den här produkten kommer från de USA- eller USDA-godkända anläggningarna.
2. Alla patientprover skall hanteras på biosäkerhetsnivå 2 enligt vad som rekommenderas för eventuellt smittsamt humanserum eller blodprov i manualen från USA:s Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som tillhandahålls kan ge motsägande resultat.

4. Natriumazid (0,09 %) används som konserveringsmedel i vissa reagenser. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparledningar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras skall man därför spola med stora mängder kranvatten för att förebygga eventuella rester i avloppsrör. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
6. Om hemolyserade eller lipemiska serum måste användas, skall inaktivt serum värmas i 30 minuter i 56 °C för optimala resultat. Mikrobiellt kontaminerade serum skall inte användas.
7. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
8. Undvik alltid stänk eller alstring av aerosoler.
9. Andra inkubationstider och temperaturer än de som anges kan orsaka felaktiga resultat.
10. Korskontamination mellan reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
11. Återanvändningsbart glas måste tvättas och sköljas noggrant och vara fritt från rengöringsmedel före användning. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
12. Placera alla reagenser, objektglas och prover i rumstemperatur (18-25 °C) före användning.
13. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
14. Mikrobiell kontamination av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
15. Pipettera aldrig med munnen och undvik kontakt med reagenser och prover med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om kontakt ändå inträffar.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodprovtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-25 °C). Serum skall separeras från koagler så snart som möjligt genom centrifugering för att minimera hemolys.

Störande ämnen: Serum som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt bör inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till felaktiga resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klaras genom centrifugering före testning.

Förvaring: Serum kan förvaras i 2-10 °C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare skall serum frysas i -20 °C eller lägre. Serum skall inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerrum.

VAR FÖRSIKTIG: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge felaktigt positiva eller felaktigt negativa resultat.

TOLKNING AV RESULTAT

KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och PBS-kontroller skall testas en gång per körning. Den positiva kontrollen skall uppvisa ljus äppelgrön fluorescens i de tillämpliga vävnadsstrukturerna med ett klart urskiljbart mönster som är karakteristiskt för det kontrollserum som använts. Den negativa kontrollen skall uppvisa låg intensitet, ospecifik, mattgrön fluorescens i vävnaden, men inget urskiljbart färgningsmönster. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av antikroppsreagens och skall inte uppvisa någon grön fluorescens. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och skall upprepas.

Det är viktigt att fluorescensintensiteten inte blandas ihop med närvaro eller frånvaro av antikroppar. Huvudfaktorn att överväga vid avgörande om en viss spädning av serum är positiv är att det finns ett klart urskiljbart mönster, oavsett fluorescensfärgningens intensitet.

Några av de många faktorer som kan påverka dina resultat kan inkludera, men är inte begränsade till:

1. Den typ av ljuskälla som används. Kvicksilverljuskällor kommer att framställa större exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts/halogen. Kvicksilverljuskällor på 50 watt, 100 watt och 200 watt skiljer sig inte mycket åt i exciteringsenergi vid 495 nm. 100 watts kvarts/halogen-ljuskällor kommer att framställa större exciteringsenergi vid 495 nm än 50 watts kvarts/halogen.
2. Ljuskällans skick och ålder. Detta gäller framför allt kvicksilverljuskällor som i allmänhet visar en gradvis minskning i exciteringsenergi vid 495 nm före utbränning. Denna gradvisa reduktion i exciteringsenergi kan leda till en märkbar förlust i känslighet över flera veckor. Detta problem kan undvikas genom att föra en loggbok. För bästa resultat, byt

ut 50 watts kvicksilverglödlampor vid 100 timmar och 100 eller 200 watts kvicksilverglödlampor vid 200 timmar. Kvarts/halogen-ljuskällor visar i allmänhet inte en gradvis reduktion i exciteringsenergi före utbränning.

3. Den typ av matarfilter som används. Störningsmatarfilter ger större känslighet vid en mycket smalare våglängd än absorptionsmatarfilter. Hänvisa till manualen för ditt fluorescerande mikroskop eller säljrepresentant för mer information.
4. Korrekt inriktning av mikroskopljusets bana. Hänvisa till manualen för ditt fluorescerande mikroskop för anvisningar.
5. Objektivets numeriska bländaröppning. Med infallande ljusfluorescens (Epi) ökar fluorescensen exponentiellt, medan den numeriska bländaröppningen (NA) ökar additivt. Detta kan göra att ett 40X-objektiv med en NA på 0,65 läser en eller flera spädningar lägre än ett 40X-objektiv med en NA på 0,85. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet.
6. Spärrfilter. Spärrfilter minskar de speciella exciteringsvåglängderna och kan användas för att minska känsligheten. Hänvisa till manualen för ditt fluorescerande mikroskop eller säljrepresentant för mer information.
7. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning, samt testmetodernas genomförande.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

100X gångers total förstoring rekommenderas för att screena positivt/negativt, medan 200X total förstoring rekommenderas för mönsterigenkänning.

Negativt: Serum anses vara negativt om färgning är mindre än eller lika med den negativa kontrollbrunn utan något klart urskiljbart mönster. Vävnaden kan visa svag färgning utan något tydligt urskiljbart mönster.

Positivt: Ett serum anses vara positivt om vävnaden visar ett klart urskiljbart färgningsmönster.

FLUORESCENSINTENSITET

Fluorescensintensitet kan semikvantifieras enligt de riktlinjer för fluorescerande antikroppsreagenser som amerikanska Centers for Disease Control and Prevention (CDC) i Atlanta, Georgia, USA har upprättat.

- 4+ Lysande gulgrön (maximal fluorescens): tydlig kontur.
- 3+ Mindre lysande gulgrön fluorescens: tydlig kontur.
- 2+ Definitivt mönster men svag fluorescens.
- 1+ Mycket dämpad fluorescens.

Ett standardobjektglas för fastställande av dessa fluorescerande intensiteter, FITC QC Slide™, katalognummer 1900, kan beställas från Immuno Concepts N.A. Ltd.

RAPPORTERING AV RESULTAT

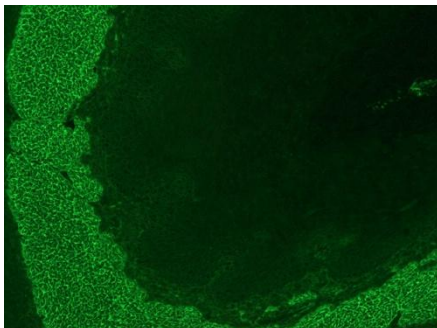
Screening: Resultat ska rapporteras som positiva eller negativa vid spädningen 1:5 och färgningsmönstret skall rapporteras.

MÖNSTERDETEKTERING

Antikroppar mot endomysium (EmA): Ett fint nätverk med fibrer ses omge glatta muskelceller i muscularis mucosae

Antigen: Vävnadstransglutaminas i endomysialt överdrag som omger glatta muskelceller.

Sjukdomssamband: Antikroppar mot endomysium ses i 95-100 % av obehandlade patienter med celiaki.

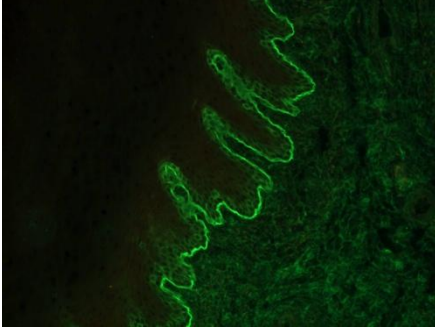


Antikroppar mot endomysium

Antikroppar med antibasalmembran: Framträdande färgning av basalmembranområdet tillsammans med dermal-epidermal korsning.

Antigen: Antigenet har identifierats som 180 kDa transmembranprotein (BP 180).

Sjukdomssamband: Dessa antikroppar förknippas med bullös eller blåsbildande pemfigoid, och har identifierats hos ungefär 70 % av patienter med denna sjukdom.

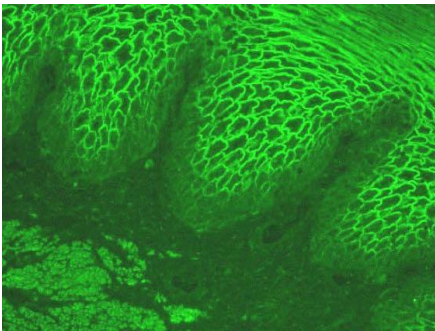


Antikroppar med antibasalmembran

Antikropp mot intracellulär cement: Färgning av det intracellulära materialet i det stratifierade epitelskiktet i esofagus.

Antigen: Antigenet har identifierats som 130 kDa desmoglein 3-protein.

Sjukdomssamband: Dessa antikroppar förknippas med den aktiva formen av pemfigus vulgaris, och har identifierats hos ungefär 90 % av patienter med denna sjukdom.



Antikropp mot intracellulärt cement

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Det går inte att ställa diagnos baserat på endast antikroppsdetektering med vävnader. Läkaren måste tolka dessa resultat i samband med patientens historia och symtom, fysiska rön och andra diagnostiska procedurer.
2. Behandling skall inte initieras endast baserat på ett positivt test för antikroppar. Kliniska indikationer, andra laboratorierön och läkarens kliniska intryck måste övervägas innan någon behandling initieras.
3. Även om en positiv reaktion kan tyda starkt på sjukdom skall den inte anses vara diagnostisk utan istället betraktas som del av patientens generella kliniska historia.
4. Färgningsmönster ändras ofta med progressiv serumtitrering. Detta fenomen beror vanligtvis på att det finns mer än ett sjukdomstillstånd.
5. På grund av de många alternativ som finns tillgängliga när det gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas det att ljuskällor, filter och optik standardiseras vid jämförelse av patienttitreringar mellan laboratorier.

Om det skulle uppstå skada på skyddsförpackningen, kontakta Immuno Concepts före användning.



Tillverkare



Auktoriserad EU-representant



Temperaturbe
gränsning



Innehåller tillräckligt för <n>
tester



Se
bruksanvisningen



In vitro diagnostisk medicinsk
apparat



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Tyskland



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA 95827, USA
Teknisk support USA: 1.800.251.5115 Utanför USA: +1-916-363-2649
E-post: technicalsupport@immunoconcepts.com

Kat 12000-01-I,

4.11.02.003.142-Sv

Rev 1.2

© Copyright 2019

HISTOFLUOR® ANTI-ENDOMYSIUM AUTOANTIKROPP (EMA) FLUORESCERANDE TESTSYSTEM FÖRFARANDE

OBS! Om laboratoriet använder ett automatiserat system för bearbetning av prover skall tillverkarens förfaranden och rekommendationer följas. Systemet för bearbetning av objektglas skall ha programmerats för lämpliga provspädningar, dispenseringsvolym och inkubationstider enligt vad som beskrivs nedan

- 1. REKONSTITUTION AV BUFFERT (PBS)**
Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. PBS-bufferten kan täckas och förvaras i 2-10 °C i högst fyra veckor.
- 2. SPÄDNING AV PATIENTPROVER**
Screening: Späd patientprover till 1:5 genom att tillsätta 0,100 ml (100 µl) serum till 0,400 ml (400 µl) rekonstituerad PBS.
- 3. IORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (30-40 µl/brunn)**
Avlägsna objektglas/-glasen från påsen/påsarna och placera kontrollserum på kontrollbrunnarna enligt följande: Vänd upp och ned på kontrollpipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen till rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (30-40 µl) patientprov i de numererade brunnarna.
Obs! För allmän screening rekommenderas den positiva kontrollen för antikroppar mot endomysium. För halvkvantitativ titrering, välj den positiva kontroll som illustrerar det mest liknande fluorescensmönstret för screeningprovet (t.ex. för patientprov som ger ett cellmönster med fluorescens vid screening för antikroppar mot endomysium, använd positiv kontroll för antikroppar mot endomysium).
VAR FÖRSIKTIG: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.
- 4. INKUBATION AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur d.v.s. 18-24 °C)**
Placera ett eller flera objektglas i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk går bra). Inkubera, med locket på, i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-24 °C).
- 5. PBS-SKÖLJNING**
Avlägsna ett eller flera objektglas från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprutflaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
Obs! Led PBS-flödet längs objektglasets mittlinje för att undvika korskontamination på objektglasen genom att först luta objektglasets mot den övre raden med brunnar och därefter mot den nedre raden med brunnar.
- 6. PBS-TVÄTTNING (10 minuter)**
Tvätta objektglasets/-glasen under tio minuter med PBS i en färgningsskål för objektglas eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.
- 7. FLUORESCERANDE ANTIKROPPSREAGENS (täck brunnarna med 12-14 droppar)**
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsbuffert. Återför omedelbart objektglasets till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med fluorescerande antikroppsreagens. Börja med att placera en droppe över varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Fluorescerande antikroppsreagens har titrerats för att kompensera för buffert som finns kvar på objektglasets efter sköljning.
Obs! Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar ut under detta förfarande för då kan substratet skadas.
TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN FLUORESCERANDE ANTIKROPPSREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON (15) SEKUNDER.
- 8. INKUBATION AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur d.v.s. 18-24 °C)**
Placera locket på inkubationskammaren och täck med en pappershandduk för att förhindra att det utsätts för ljus, om kammaren inte är ogenomskinlig. Inkubera objektglasets/-glasen i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-24 °C).
- 9. PBS-SKÖLJNING**
Avlägsna objektglasets/-glasen från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- 10. PBS-TVÄTTNING (10 minuter)**
Tvätta objektglasets/-glasen under tio minuter med PBS i en färgningsskål för objektglas eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas när motfärgning inte används.
- 11. MONTERING AV SKYDDSREMSOR**
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsbuffert.
TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN SKYDDSREMSA UNDER LÄNGRE ÄN (15) FEMTON SEKUNDER. Lägg till tillräckligt med halvpermanent monteringsmedel för täcka över brunnarna i varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från objektglasets ena ände till den andra.
Obs! Överflödigt monteringsmedel på objektglasets kan leda till hög bakgrundsfluorescens på grund av ljusspridning, eller brist på tydlig upplösning av celler (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglasets genom att försiktigt torka skyddsremsan med läskpapper eller linspapper samtidigt som man undviker all direkt beröring av skyddsremsan.

FÖR TEKNISK SUPPORT:

USA: 1-800-251-5115 Utanför USA: +1-916-363-2649
E-postadress: technicalsupport@immunoconcepts.com