

FITC QUALITY CONTROL SLIDE™

Optimal fluorescent microscopy requires consistent performance of the microscope optical systems. Results obtained with serum reference standards, such as those available from the Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, may be useful indicators of changes in sensitivity, but they were designed more as guides to identify staining patterns. The performance characteristics of the fluorescent microscope itself are an important factor in the evaluation of fluorescent intensity and in the subsequent assessment of sensitivity. Comparison of fluorescent staining intensities on fluorescent microscopes requires the use of quantitative standards that have the same fluorescent spectra as the cells used in the FITC test procedures.

The FITC QC Slide™ permits daily monitoring of microscope performance and comparison of test results requiring fluorescent microscopy. In addition, these reference slides serve as a convenient and sensitive check on field illumination uniformity, as well as stability of the illuminator source. It is highly recommended that these slides be used in conjunction with specific antibody reference standards. The relative brightness of cells stained in FITC test procedures can be compared to these reference microbeads.

The Immuno Concepts FITC QC Slide™ contains five levels of fluorescent microbead standards. The immobilized microbeads contain uniform levels of fluorescein isothiocyanate (FITC) standardized to demonstrate the same excitation and emission spectra as fluorescence read from cells complexed with fluorescent antibody conjugates. The intensities stated were set in our laboratory in collaboration with Dr. Eng Tan at the Scripps Clinic and Research Foundation. The stated intensities may differ from yours. To be assured of a minimum threshold of sensitivity with your fluorescent microscope system, the endpoint of positive staining should be observed with the microbeads on the 1+ or +/- wells. If you do not obtain results in this range, see troubleshooting sensitivity differences below.

USE OF THE IMMUNO CONCEPTS FITC QUALITY CONTROL SLIDE™

1. Set up the microscope for viewing at a total magnification of 200X.
2. Begin viewing at the +/- well and proceed to the 1+, 2+, 3+ and 4+ well, noting at which well positive staining of the microbeads is observed. (Move quickly from field to field to reduce photo bleaching.) The endpoint is the first well in which positive staining in the majority of the microbeads is observed.
3. Store the slides at 2-10°C and protect from light when not in use.

NOTE: With repeated use of the Immuno Concepts FITC QC Slide™, areas of diminished fluorescence may be observed. Always view fields with consistent intensity between beads. Discard the slide when over 50% of the microbeads in each field demonstrate diminished fluorescence.

TROUBLESHOOTING SENSITIVITY DIFFERENCES

Low Sensitivity:

If your endpoint for positive staining of the fluorescent microbeads is 4+, 3+, or 2+, check the following items:

1. **Proper alignment of the microscope light path.** Refer to your fluorescent microscope manual for instructions.
2. **The type of light source used.** Mercury light sources will produce greater excitation energy at 495 nm than Quartz/Halogen. The 50-watt, 100-watt, and 200-watt Mercury light sources differ little in excitation energy at 495nm. The 100-watt Quartz/Halogen light sources will produce greater excitation energy at 495nm than 50-watt Quartz/Halogen.
3. **The condition and age of the light source.** This is particularly true for Mercury light sources which generally exhibit a gradual reduction in excitation energy at 495nm prior to burning out. This gradual reduction in excitation energy can result in a significant loss in sensitivity over several weeks. This problem can be avoided by keeping a time log. For best results replace 50-watt mercury bulbs at 100 hours, and 100 or 200-watt mercury bulbs at 200 hours. Quartz/Halogen light sources generally do not exhibit a gradual reduction in excitation energy prior to burning out.
4. **The type of exciter filter used.** Interference exciter filters provide greater sensitivity over a much narrower wavelength than absorption exciter filters. Refer to your fluorescent microscope manual or sales representative for more information.
5. **The numerical aperture of the objective.** With incident light fluorescence (Epi), fluorescence is increased exponentially as the numerical aperture (NA) of the objective is increased additively. This may cause a 40X objective with a NA of 0.65 to read one or more dilutions lower than a 40X objective with a NA of 0.85. The numerical aperture is printed on the side of the objective. Sensitivity of transmitted light fluorescent microscopy is not affected by NA.
6. **Reference sera and normal studies.** Sensitivity is always relative to performance characteristics of the test with positive reference sera and your specific patient population.

High Sensitivity:

If strong positive staining of the fluorescent microbeads is seen at the +/- well, check the following items:

1. **Reference sera and normal studies.** Sensitivity is always relative to performance characteristics of the test with positive reference sera and your specific patient population.
2. **Suppression filters to reduce sensitivity.** Suppression filters reduce specific wavelengths of excitation and may be useful in reducing sensitivity. Refer to your fluorescent microscope manual or sales representative for more information.

**For Technical Assistance: telephone 1-916-363-2649 or 1-800-251-5115 (USA Toll Free)
Facsimile: 1-916-363-2843 or email technicalsupport@immunoconcepts.com**

Une microscopie à fluorescence optimale requiert des performances consistantes des systèmes optiques de microscope. Les résultats obtenus à l'aide de sérums étalons de référence, tels que ceux disponibles auprès du Centers for Disease Control, Atlanta, Géorgie, peuvent être utiles pour indiquer les



**immuno
concepts®**

FITC QUALITY CONTROL SLIDE™

changements de sensibilité, mais ont été principalement conçus pour servir de guides pour identifier les motifs de coloration. Les performances du microscope à fluorescence jouent un rôle important dans l'évaluation de l'intensité de fluorescence ainsi que dans l'évaluation ultérieure de la sensibilité. La comparaison des intensités de la coloration par fluorescence sur les microscopes à fluorescence requiert l'utilisation d'étalons quantitatifs qui ont le même spectre fluorescent que les cellules utilisées dans les procédures d'essai FITC.

La lame FITC QC Slide™ permet une surveillance quotidienne des performances du microscope et la comparaison des résultats de test nécessitant une microscopie à fluorescence. En outre, ces lames de référence permettent une vérification pratique et sensible de l'uniformité de l'illumination du champ, ainsi que de la stabilité de la source d'illumination. Il est fortement recommandé que ces lames soient utilisées conjointement aux étalons de référence des anticorps spécifiques. La luminosité relative des cellules colorées par les procédures de test FITC peut être comparée à ces microbilles de référence.

La lame FITC QC Slide™ d'Immuno Concepts contient cinq niveaux d'étalons de microbilles fluorescentes. Les microbilles immobilisées contiennent des niveaux uniformes normalisés d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pour démontrer le même spectre d'excitation et d'émission que la fluorescence lue à partir de cellules complexées avec des conjugués d'anticorps fluorescents. Les intensités mentionnées ont été définies dans notre laboratoire en collaboration avec le Dr Eng Tan à la Scripps Clinic and Research Foundation. Les intensités mentionnées peuvent différer des vôtres. Pour garantir un seuil minimum de sensibilité avec votre système de microscope à fluorescence, le critère d'évaluation d'une coloration positive doit être observé avec les microbilles dans les puits 1+ ou +/- . Si les résultats obtenus n'appartiennent pas à cette plage, consultez la résolution de problèmes de différence de sensibilité ci-dessous.

UTILISATION DE LA LAME FITC QUALITY CONTROL SLIDE™ D'IMMUNO CONCEPTS

1. Régler le microscope pour une visualisation à un grossissement total de 200x.
2. Commencer la visualisation au puits +/- et passer aux puits 1+, 2+, 3+ et 4+, en notant dans quel puits une coloration positive des microbilles a été observée. (Passer rapidement d'un champ à l'autre pour réduire le blanchissage optique.) Le critère d'évaluation est le premier puits dans lequel une coloration positive est observée pour la majorité des microbilles.
3. Stocker les lames à une température de 2 à 10 °C et les protéger de la lumière lorsqu'elles ne sont pas utilisées.

REMARQUE : Avec l'utilisation répétée de la lame FITC QC Slide™ d'Immuno Concepts, des zones de fluorescence diminuée peuvent être observées. Toujours visualiser les champs avec une intensité cohérente entre les billes. Jeter la lame lorsque plus de 50 % des microbilles dans chaque champ démontrent une fluorescence diminuée.

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES DE DIFFÉRENCES DE SENSIBILITÉ

Faible sensibilité :

Si votre critère d'évaluation pour une coloration positive des microbilles fluorescentes est 4+, 3+ ou 2+, vérifiez les éléments suivants :

1. **Alignement correct de l'axe optique du microscope.** Se reporter au manuel du microscope à fluorescence pour obtenir des instructions.
2. **Type de source lumineuse utilisé.** Les sources de lumière au mercure génèrent une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz ou l'halogène. Les sources de lumière au mercure 50 watts, 100 watts et 200 watts diffèrent peu en matière d'énergie d'excitation à 495 nm. Les sources de lumière au quartz ou à l'halogène 100 watts génèrent une plus grande énergie d'excitation à 495 nm que le quartz ou l'halogène 50 watts.
3. **État et âge de la source lumineuse.** Cela est particulièrement vrai pour les sources de lumière au mercure qui affichent généralement une réduction progressive de l'énergie d'excitation à 495 nm avant de griller. Cette réduction progressive de l'énergie d'excitation peut entraîner une perte de sensibilité importante au fil des semaines. Il est possible d'éviter ce problème par la tenue d'un journal. Pour de meilleurs résultats remplacer les ampoules au mercure de 50 watts toutes les 100 heures et les ampoules au mercure de 100 ou 200 watts toutes les 200 heures. Les sources de lumière au quartz ou à l'halogène n'affichent généralement pas de réduction progressive de l'énergie d'excitation avant de griller.
4. **Type de filtre d'excitation utilisé.** Les filtres d'excitation interférentiels offrent une plus grande sensibilité sur une longueur d'onde beaucoup plus étroite que les filtres d'excitation absorbants. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant commercial pour plus d'informations.
5. **Ouverture numérique de l'objectif.** Grâce à la lumière incidente (Epi), la fluorescence augmente de manière exponentielle à mesure que l'ouverture numérique (ON) de l'objectif augmente. Cela peut amener un objectif 40X avec une ON de 0,65 à lire une ou plusieurs dilutions inférieures à un objectif 40X avec une ON de 0,85. L'ouverture numérique est indiquée sur le côté de l'objectif. La sensibilité de la microscopie à fluorescence utilisant la lumière transmise n'est pas affectée par l'ON.
6. **Sérums de référence et études normales.** La sensibilité dépend toujours des performances de test avec des sérums de référence positifs et de votre population de patients spécifique.

Sensibilité élevée :

Si une forte coloration positive des microbilles fluorescentes est observée dans le puits +/-, vérifiez les éléments suivants :

1. **Sérums de référence et études normales.** La sensibilité dépend toujours des performances de test avec des sérums de référence positifs et de votre population de patients spécifique.
2. **Filtres de suppression pour réduire la sensibilité.** Les filtres de suppression réduisent des longueurs d'onde d'excitation précises et peuvent être utiles pour réduire la sensibilité. Se reporter au manuel du microscope à fluorescence ou contacter le représentant commercial pour plus d'informations.

Pour une assistance technique : téléphone 1-916-363-2649 ou 1-800-251-5115 (appel gratuit aux États-Unis)

Télécopie : 1-916-363-2843 ou envoyer un e-mail à technicalsupport@immunoconcepts.com



**immuno
concepts®**