

MASTAFLUOR™ SKMA

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen die Skelettmuskulatur in humanem Serum und Plasma an Gewebeschnitten von Rattenoberschenkelmuskulatur

Immunofluorescence assay for the detection of IgG anti-skeletal muscle antibodies in human serum and plasma with tissue sections of rat thigh muscle

Gebrauchsinformation / Instructions for Use

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



Deutsch: Seiten 02–04



English: Pages 05–07

MASTAFLUOR™ SKMA

REF 606064

10 x 5 Tests

Hersteller / Manufactured by:

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

Distribué per:

MAST Diagnostic
115, Rue Jules Barni
F-80000 Amiens
France
Phone: + 33 3 22808067
Fax: + 33 3 22809922
Web: www.mastgrp.com
Email : service-commercial@
mast-diagnostic.fr

Einführung

Autoimmunerkrankungen werden durch Störungen der immunologischen Reaktionen zellulärer und/oder humoraler Art hervorgerufen. Diese Reaktionen, welche normalerweise gegen äußere Einflüsse ablaufen, können sich unter bestimmten Umständen gegen den Körper selbst richten und dadurch verschiedene Krankheiten hervorrufen.

Antikörper gegen die Skelettmuskulatur (SKMA), die gegen verschiedene Antigene aus quergestreifter Skelettmuskulatur, Herzmuskel und Thymuszellen gerichtet sind, reagieren vorzugsweise mit dem I-Band (nur Aktinfilamente), aber auch mit dem A-Band (dicke und dünne Myofilamente) sowie den Z-Scheiben der Sarkomere.

SKMA-Antikörper in einem Titer über 1:60 kommen vor allem bei der Myasthenie mit gleichzeitigem Thymom vor, seltener bei der Polymyositis und anderen Muskelerkrankungen.

Hohe Titer weisen auf ein Thymom, eine schwere Verlaufsform oder eine Exazerbation hin. Ständig hohe Titer können Zeichen einer schlechten Prognose sein, während ein Titerabfall auf eine Besserung hinweist. Bei jüngeren Patienten, zu Beginn der Erkrankung und bei bestimmten HLA-Antigentägern findet man häufiger Antikörper. Nach der Thyrektomie brauchen die Titer nicht abzufallen.

Verwendungszweck

Der Nachweis von SKMA erfolgt mit Hilfe von Rattenoberschenkelmuskulatur-Gewebeschnitten. Ist eine Probe positiv, so wird eine grüne Fluoreszenz der spezifischen Zellstrukturen im Gewebe sichtbar.

Testprinzip

Das verdünnte Probenmaterial (Serum, Plasma) wird zusammen mit den erforderlichen Kontrollen auf die Testfelder des Objektträgers pipettiert. Die Testfelder sind mit einem Gewebeschnitt von Rattenoberschenkelmuskulatur 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-konjugierte Anti-human-IgG-Antikörper. Anschließend werden unspezifisch oder nicht gebundene Reaktionskomponenten durch einen Waschschrift entfernt. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Testfelder ausgewertet. Liegen Antikörper gegen SKMA im Serum vor, kommt es zu spezifischen Fluoreszenzen auf dem Gewebeschnitt von Rattenoberschenkelmuskulatur.

Packungsinhalt

Inhalt	100 Tests	50 Tests	Spezifikation
Objektträger	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Beschichtet mit einem Gewebeschnitt von Rattenoberschenkelmuskulatur
Positives Kontrollserum	0,5 mL	0,5 mL	Positives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
Negatives Kontrollserum	0,5 mL	0,5 mL	Negatives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
FITC-Konjugat	3 mL	2 mL	FITC-konjugierte Anti-human-IgG, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
Evans Blue	3 mL	3 mL	Gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
Eindeckmedium	3 mL	3 mL	Gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
PBS	2 Sachets	2 Sachets	Je 1 Sachet in 1 L destilliertem Wasser lösen, pH 7,2 ± 0,2

Zusätzlich benötigte Materialien

Sterile Reaktionsgefäße

Mikropipetten und dazu passende Spitzen

Küvetten

Feuchte Kammer

Messkolben oder Messbecher

Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

Pinzette

Deckgläser

(Wasch-) Pufferflasche

Fluoreszenzmikroskop mit einem 490 nm Anregungsfilter (Blauanregung) und 510 nm Sperrfilter und Farbteiler.

Haltbarkeit und Lagerung

Der MASTAFLUOR™ SKMA 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 48 Stunden 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 Einmalspitzen und Einmalreaktionsgefäße verwendet werden. Es dürfen nur gereinigte Laborgläser verwendet werden, die nach dem Spülen mit destilliertem Wasser ab gespült 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 letztendlicher 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. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid oder Proclin als Konservierungsmittel. Beide Reagenzien reagieren bei Inkorporation toxisch. Natriumazid kann mit Metallen (Blei, Kupfer) explosive Metallazidverbindungen bilden. Bei der Entsorgung von Azidreagenzien über den Labrabfluss 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 Patientenseren 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 1 Tropfen (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-Puffer 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 entsprechenden 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 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.

Nach der Evans Blue Färbung die Objektträger kurz in eine Küvette mit frischem PBS tauchen, um Reste des Evans Blue abzuspülen.
16. Einen kleinen Tropfen Eindeckmedium auf jedes Testfeld tropfen und mit einem Deckglas den Objektträger eindecken.

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

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

Interpretation und diagnostische Bedeutung

Die Beurteilung erfolgt stets im Vergleich mit der positiven und negativen Kontrolle.

Sind Antikörper gegen die Skelettmuskulatur vorhanden, so zeigt sich eine feine, durchgehende Fluoreszenz der Querstreifen vertikal zu den Myofibrillen.

Diese Fluoreszenz wird durch die Bindung der spezifischen Antikörper an die verschiedenen Regionen des Sarkomers (I-Band, aber auch A-Band und Z-Scheiben) der quergestreiften Skelettmuskulatur erreicht.

Um eine Unterscheidung der Antikörperbindung an I- und A-Band zu treffen, ist es ratsam, ein Phasen-Kontrast-Bild zu Hilfe zu nehmen.

Grenzen des Nachweisverfahrens / Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen sind nicht bekannt.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Bei diesem Immunfluoreszenztest zeigt die Fluoreszenzstärke der Kontrollen, im Interlot und Interassay, keinen Unterschied.

Interne Qualitätskontrolle für den Anwender (Validität)

Die zwei Kontrollen sollten bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Die Sollwerte der positiven und negativen Kontrolle entnehmen Sie bitte den Daten auf dem Qualitätskontroll-Zertifikat. Werden die Sollwerte nicht erreicht, sind die Testergebnisse der Proben invalide und der Test muss wiederholt werden. Bei jeder neuen Kit-Charge sollte eine interne Qualitätskontrolle durchgeführt werden, z. B. durch Testung einer oder mehrerer interner Kontrollproben, welche klar spezifiziert sein müssen.

Introduction

Auto-immune diseases are caused by a disorder of the cellular and/or humoral immunological reaction. These reactions which normally occur against external influences may under certain circumstances turn against the body itself and thereby cause various diseases.

Anti-skeletal muscle antibodies are directed against a variety of cytoplasmic components of the cross stripes of skeletal and heart muscle, also of thymic cells. They react predominantly with the I- but also with the A-band and the Z-stripes of the sarcomere and with the sarcoplasmic reticulum. The biochemical antigens are myosin, heavy-meromyosin, actin and others.

Anti-skeletal muscle antibodies with titers higher than 1:60 mainly occur with myasthenia combined with thymom, more rarely with polyomyositis and other muscular diseases. High titers indicate a thymom, a server form or an exacerbation. Permanent high titers may be marker of a poor prognosis, while the decrease of titer indicates an improvement.

These antibodies are observed more often in younger patients, at the beginning of the illness and in carriers of certain HLA antigens. Following thymectomy titres may not necessarily decrease.

Intended Use

The determination is performed using tissue sections of rat thigh muscle. A sample is considered positive if a green fluorescence of specific cell structures of the tissue sections is visible.

Test Principle

IFA slides are coated with combined sections of rat thigh muscle. 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 FITC-conjugated anti-human IgG antibodies. 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 with rat thigh muscle tissue.

Kit Contents

Content	100 Tests	50 Tests	Specifications
Slides	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Coated with tissue section of rat thigh muscle
Positive control	0.5 mL	0.5 mL	Positive serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
Negative control	0.5 mL	0.5 mL	Negative serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
FITC-conjugate	3 mL	2 mL	FITC-conjugated anti-human IgG, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
Evans Blue	3 mL	3 mL	Ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
Mounting Medium	3 mL	3 mL	Ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
PBS	2 Sachets	2 Sachets	1 sachet to be diluted in 1 L of distilled water, pH 7.4 ± 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-fluorescent microscope with a 490 nm excitation filter and a 510 nm barrier filter
9. Cover slips
10. Wash bottle

Stability and Storage

MASTAFLUOR™ SKMA is stable until 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 48 hours prior to use or for longer storage at -20 °C. Repeated freezing and thawing of specimens should be avoided.

Warnings and Precautions

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure.
3. Do not use kit beyond the expiry date.
4. Wear appropriate protective clothing and use appropriate facilities.
5. Do not mouth pipette.
6. Use disposable plastic ware where ever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. 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 disease. 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 of and incinerated. Contaminated glassware should either be autoclaved at 121 °C for 1 hour 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. 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 of 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 slide. 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 min.
13. Switch on microscope 15 min 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. Remove the slides from the PBS after washing and blot dry as in step 10.
17. 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.

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

Interpretation and diagnostic relevance

The evaluation should always be performed with the positive and negative controls.

The presence of anti-skeletal muscle antibodies is indicated by fine and continuous fluorescent cross lines vertical to the myofibrils.

This is caused by the binding of specific antibodies to the various regions of the sarcomere mainly in the regions of the I- but also of the A-band and Z-stripes.

To distinguish between the fluorescence of the I- and the A-band, a phase-contrast picture is advised.

Limitations / Cross reactions

Cross-reactivity

Cross-reactivities are unknown.

Precision and reproducibility

With this immunofluorescence assay, no difference in the Interlot and Interassay variability by using the controls could be detected.

Internal quality control for user

All controls should be carried with every test run. The desired values of the positive and negative controls should be taken from the Lot specific data given on the Quality Control Certificate. If controls give invalid levels then results from test samples are invalid, requiring retesting. For every new lot, an internal quality control should be performed by testing one or more internal control samples which should be clearly specified.

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

SLIDES	Objekträger	Slides
CONTR +	Positive Kontrolle	Positive control
CONTR -	Negative Kontrolle	Negative control
CONJ	FITC-Konjugat	FITC-conjugate
BUFFER	PBS Waschpuffer	PBS Washing buffer
EVANS BLUE	Evans Blau	Evans Blue
MOUNTING MEDIUM	Eindeckmedium	Mounting Medium
LOT	Charge	Batch
REF	Bestellnummer	Order code
AHG	Anti-Human-Globulin	Anti-human globulin
RTU	Gebrauchsfertig	Ready to use
	Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use
	Wichtige Hinweise beachten	Important notes
	Verfallsdatum	Expiry Date
	Lagerung bei	Storage