

MegaFLUO® ANA HEp2 ad us. vet..

In vitro Diagnostikum

Testkit zum indirekten semiquantitativen Immunfluoreszenz-Nachweis
antinukleärer Antikörper im Plasma oder Serum des Hundes

GEBRAUCHSINFORMATION



6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMATIONEN ZUM TESTKIT

TESTKITKOMPONENTEN

1 Testkit MegaFLUO® ANA HEp2 enthält:

- 10 Objektträger, beschichtet mit HEp2-Zellen
- 1 Tropfflasche mit 3,0 ml FLUO FITC Anti-Hund-IgG-Konjugat
- 1 Tropfflasche mit 0,5 ml Positivkontrolle
- 1 Tropfflasche mit 0,5 ml Negativkontrolle
- 1 Tropfflasche mit 3,0 ml Eindeckmittel
- 1 Gebrauchsinformation

PROBENMATERIAL

Serum oder Plasma

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Die Lagertemperatur für das gesamte Testkit beträgt +2–8°C
- Die unterschiedlichen Angaben von Lagertemperaturen auf den Etiketten der Einzelkomponenten beziehen sich auf deren Lagerung bei Einzelkauf (→ anderes Verfallsdatum).
- Die Haltbarkeit beträgt 12 Monate ab Herstellung.

NOTWENDIGES, NICHT IM TESTKIT ENTHALTENES MATERIAL

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) pH 7,2–7,4, Gefäß zum Waschen mit PBS, Reaktionsgefäße für Serumverdünnungen, Mikroliterpipetten, 24×50 mm Deckgläser, Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Anregungswellenlänge 465–495, Grenzfilter 515–555) und 400× Vergrößerung, Brutschrank mit 37°C, feuchte Kammer.

HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

SYMBOLERKLÄRUNG

- Lagerung 2–8°C – siehe Etikett
- Für den tierärztlichen Gebrauch
- In vitro Diagnostikum
- Gebrauchsinformation genau beachten
- Verwendbar bis – siehe Etikett
- Chargen-Bezeichnung
- Keine Reagenzien verschiedener Testkits, Chargennummern oder mit abgelaufenem Verfallsdatum verwenden.

2. TESTPRINZIP

Hundeseren werden mit PBS (pH 7,2–7,4) entsprechend verdünnt und auf die Antigenfelder aufgebracht, um im Fall einer positiven Probe eine Antigen-Antikörperbindungsreaktion bei 37°C zu ermöglichen. Durch anschließendes Spülen mit PBS werden nicht-gebundene, unspezifische Serumproteine abgewaschen. Im nächsten Schritt wird das fluoreszenzmarkierte FLUO FITC Anti-Hund-IgG-Konjugat aufgebracht, welches an die Antigen-Antikörperkomplexe bindet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wird nicht-gebundenes Konjugat mit PBS abgespült. Abschließend werden die Antigenfelder mit Eindeckmittel und Deckglas abgedeckt. Die Beurteilung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop (Filtersystem für FITC) bei 400× Vergrößerung.

3. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Stellen Sie sicher, dass die exakte Zuordnung der Testkitkomponenten zum jeweiligen Patienten gewährleistet ist.
- Für jede Probe bzw. Verdünnung eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Das Konjugat ist photosensitiv und wärmeempfindlich, deshalb sollte es bis kurz vor Testung in Dunkelheit bei 2–8°C gelagert werden.
- Das Konjugat enthält Evans-Blau als Farbstoff, das potentiell krebserregend ist. Hautkontakt und Ingestion sind unbedingt zu vermeiden.
- Das Probenmaterial und die Objektträger müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.

4. WICHTIGE ZUSATZINFORMATIONEN ZUR TESTAUSWERTUNG

Die Testergebnisse sind grundsätzlich in Verbindung mit der Anamnese, der Klinik sowie mit zusätzlichen Laborparameter zu interpretieren.

Die Interpretation des Testergebnisses hängt ab von Fluoreszenzmuster, Titer des Autoantikörpers und Alter des Hundes!

5. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die Testkitkomponenten (außer Konjugat!) und die zu testenden Seren sollten zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben.
2. Stellen Sie entsprechende Verdünnungen (z. B. 1:50 und 1:100) mit PBS für alle zu testenden Seren her. Für Seren, welche in einem früheren Test positiv beurteilt wurden, empfiehlt es sich, 2-fach-Serienverdünnungen mit PBS herzustellen, um den Endtiter (= höchste, noch positive Verdünnung) zu bestimmen.
3. Entnehmen Sie die Objektträger vorsichtig der Verpackung und legen Sie sie in die feuchte Kammer. Tragen Sie auf jeden Objektträger 1 Tropfen (20 µl) der Positiv- und Negativkontrolle auf separate Antigenfelder auf. Pipettieren Sie von jeder Serumverdünnung ebenfalls 20 µl auf separate Antigenfelder (Abb.1). Achten Sie darauf, dass die Antigenfelder vollständig benetzt sind.
4. Inkubieren Sie für 30 Minuten bei 37°C.
5. Waschschrift: Klopfen Sie die Serumverdünnungen vorsichtig ab und schwenken Sie die Objektträger 5 Minuten in PBS. Wiederholen Sie den Schritt für weitere 5 Minuten in frischem PBS. Spülen Sie anschließend die Objektträger kurz mit dest. Wasser ab. Klopfen Sie vorsichtig überschüssiges Wasser ab und trocknen Sie gegebenenfalls vorsichtig die Teflonbeschichtung zwischen den Antigenfeldern mit saugfähigem Papier oder Wattestäbchen. Lassen Sie jedoch die Antigenfelder nicht austrocknen!
Sollten Sie zum Waschen eine Spritzflasche verwenden, richten Sie den Strahl nicht direkt auf die Antigenfelder.
6. Legen Sie die Objektträger zurück in die feuchte Kammer und tragen Sie sofort auf jedes verwendete Antigenfeld 1 Tropfen FLUO FITC Anti-Hund-IgG-Konjugat auf (Abb.2). Achten Sie darauf, dass die Antigenfelder vollständig benetzt sind.
7. Inkubieren Sie für 30 Minuten bei 37°C und in Dunkelheit, um das photosensitive Konjugat zu schützen.
8. Wiederholen Sie den Waschschrift, wie in Punkt 5 beschrieben.
9. Geben Sie einige Tropfen Eindeckmittel auf Deckgläser und legen Sie diese vorsichtig auf die Objektträger. Versuchen Sie, etwaige Luftblasen vorsichtig herauszudrücken.
10. Werten Sie die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop bei 400× Vergrößerung aus (Abb.3), indem Sie die Fluoreszenzmuster der Proben mit denen der Positiv- bzw. Negativkontrolle vergleichen.
11. Versiegelte Objektträger können bei 2–8°C im Dunkeln bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

6. TESTAUSWERTUNG

Für die Auswertung wird ein Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtersystem für FITC (Anregungswellenlänge 465–495, Grenzfilter 515–555) und einer Vergrößerung von 400× benötigt.

Die Fluoreszenzbilder (Form, Dichte etc.) der Negativ- und Positivkontrolle gelten grundsätzlich als Referenzbilder. Davon abweichende Reaktionsmuster sind als unspezifisch, sprich negativ zu bewerten!

Positives Fluoreszenzbild ≥ 1:50

Eine deutliche, gelb-grüne Fluoreszenz ist sichtbar.

Eine positive Reaktion kann verschiedene Muster der nukleolären und/oder cytoplasmatischen gelbgrünen Fluoreszenz zeigen. Jegliche gelbgrüne Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:50 wird als positiv gewertet.

„Homogenes Muster“: Homogene oder diffuse gelbgrüne Fluoreszenz des gesamten Zellkerns aufgrund von Autoantikörpern gegen native DNA-Histone und/oder DNP (Desoxyribonucleoprotein). Die Chromosomen der mitotischen (sich teilenden) Zelle sind wichtige Kennzeichen eines homogenen Musters, da sie sich als unregelmäßig gefärbte Masse mit intensiveren Randbereichen zeigen.

„Gesprenkeltes Muster“ (am häufigsten)! Zellen, die sich nicht teilen, zeigen eine gleichmäßige, „wirklich gesprenkelte“ gelbgrüne Fluoreszenz mit Seren mit Zentromer-Antikörpern. Die chromosomalen Bereiche von mitotischen Zellen werden nicht angefärbt; ihr Cytoplasma zeigt ein paar Sprenkel.

„Nukleoläres Muster“: Homogene, geklumpte oder gesprenkelte Färbung des Nukleolus, oft verbunden mit einer trüben, homogenen Fluoreszenz im Rest des Nukleolus. In mitotischen Zellen werden Chromosomen nicht angefärbt.

„Peripherales Muster“: Hauptsächliche Anfärbung der Peripherie der Zellkerne.

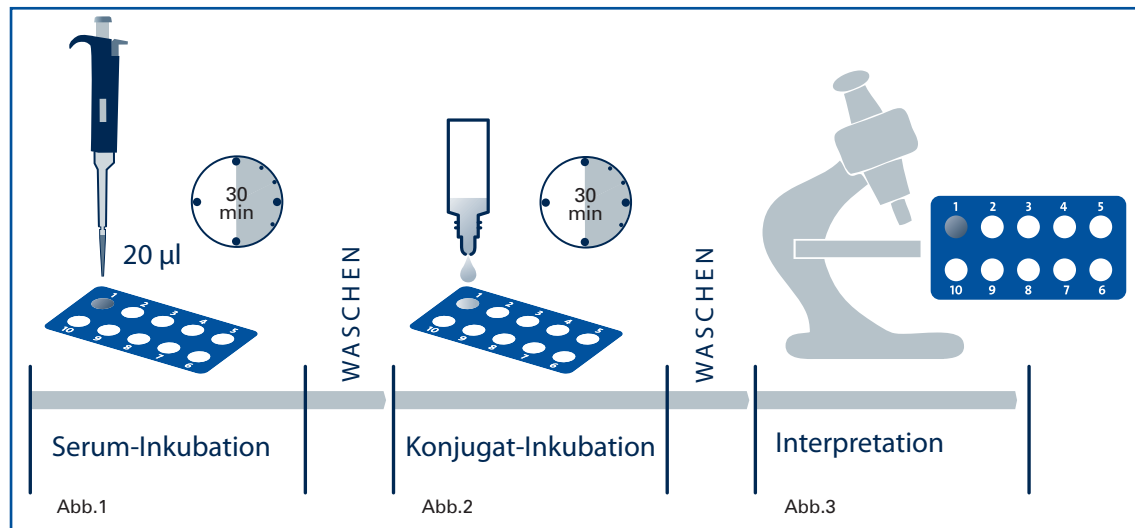
Grenzwertiges Fluoreszenzbild 1:25

Eine geringe, gelbgrüne Fluoreszenz (1+) ist sichtbar.

Negatives Fluoreszenzbild < 1:25

Keine gelbgrüne Fluoreszenz.

Abbildungen finden Sie unter <http://www.megacor.at>



MegaFLUO® ANA HEp2 ad us. vet.

In vitro diagnosticum

Test-kit for the indirect semiquantitative immunofluorescence detection of antinuclear antibodies in plasma or serum of the dog

INSTRUCTIONS FOR USE



6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMATION ON THE TEST-KIT

TEST-KIT COMPONENTS

1 Test-kit MegaFLUO® ANA HEp2 contains:

- 10 slides, coated with HEp2 cells
- 1 dropper bottle with 3.0 ml FITC anti-dog IgG conjugate
- 1 dropper bottle with 0.5 ml Positive Control
- 1 dropper bottle with 0.5 ml Negative Control
- 1 dropper bottle with 3.0 ml Mounting Medium
- 1 instructions for use

SAMPLE MATERIAL

Serum or plasma

STORAGE AND STABILITY

- The storage temperature for the whole testkit is **+2–8°C**
- The different declarations of storage temperatures on the labels of the single components refer to their storage on individual purchase (→ another expiry date).
- Shelf life: 12 months after manufacturing.

MATERIAL REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

PBS (phosphate buffered saline) pH 7.2–7.4, washbasin for PBS, test tubes for serum dilutions, microlitre pipettes, 24x50 mm cover slips, fluorescence microscope with filter system for FITC (fluorescein isothiocyanate, excitation wavelength 465–495, barrier filter 515–555) and 400× magnification, 37°C incubator, humid chamber.

LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

2. TEST PRINCIPLE

Dog sera are diluted in PBS (pH 7.2–7.4) and dropped onto the slide wells to allow an antigen-antibody reaction at 37°C in the case of a positive sample. By subsequent washing with PBS, non-bound unspecific serum proteins are washed off. In the next step, fluorescein-marked FLUO FITC anti-dog IgG conjugate is added which binds to the antigen-antibody complexes. After an incubation time of 30 minutes, non-bound conjugate is washed off with PBS. Finally, the wells are covered with Mounting Medium and cover slip. Evaluation is done with a fluorescence microscope (filter system for FITC) with 400× magnification.

3. PRECAUTIONS FOR USERS

- Make sure that the test-kit components can be correlated exactly to the particular patient.
- Use a new pipette tip for each sample or dilution.
- The conjugate is photosensitive and sensitive to heat, therefore it should be stored in the dark at 2–8°C.
- The conjugate contains Evans-blue dye, which is potentially carcinogenic. Avoid ingestion and skin contact.
- The sample material and the slides must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly after test procedure, together with the used test-kit components.

4. IMPORTANT ADDITIONAL INFORMATION FOR TEST EVALUATION

The interpretation of test results should always be based on anamnestic and especially clinical data and additional laboratory parameters.

Note that the interpretation of the test results depends on the pattern observed, the titre of the autoantibody and the age of the dog.

5. TEST PROCEDURE

1. The test-kit components (apart from conjugate!) and the sera to be tested should have room temperature at the time of application.
2. Prepare appropriate dilutions (e.g. 1:50 and 1:100) with PBS for all sera to be tested. For sera found positive on a previous test it is recommended to prepare serial two-fold dilutions in PBS to determine the endpoint titre (= highest dilution that is still positive).
3. Carefully remove the slides from their foil pouch shortly before use and place them into the humid chamber. Apply 1 drop (20 µl) of the Positive and Negative Control on each slide on separate antigen wells. Pipette 20 µl of every serum dilution on separate antigen wells (fig.1). Take care that the antigen wells are completely covered.
4. Incubate for 30 minutes at 37°C.
5. Washing step: Tap remaining serum dilutions gently from the slides and shake the slides gently for 5 minutes in PBS. Repeat this step for another 5 minutes with fresh PBS. Briefly rinse the slides with distilled water. Tap remaining water gently from the slides and, if necessary, dry the teflon mask between the wells with absorbent paper or cotton bud sticks. However, do not allow the antigen wells to dry out!
If using a washing bottle, do not focus the stream directly onto the antigen wells!
6. Place the slides back into the humid chamber and immediately drop 1 drop of FLUO FITC anti-dog IgG conjugate onto each used well (fig.2). Take care that the antigen wells are completely covered.
7. Incubate for 30 minutes at 37°C and in the dark to protect the photosensitive conjugate.
8. Repeat washing step as described in step 5.
9. Add some drops of Mounting Medium on the cover slips and place them carefully on the slides. Try to remove any possible bubbles carefully.
10. Evaluate the slides using a fluorescence microscope at 400× magnification (fig.3), comparing each well to the fluorescence pattern seen in the Positive and Negative Controls.
11. Sealed slides can be stored at 2–8°C in the dark for up to 7 days.

6. TEST EVALUATION

For the evaluation, a fluorescence microscope with a filter system for FITC (excitation wavelength 465–495, barrier filter 515–555) and 400× magnification is required.

The fluorescence pattern (form, density etc.) of the Negative and Positive Control is considered as reference pattern. Patterns of reactivity different than that seen in the Controls must be considered non-specific, which means negative!

Positive fluorescence pattern ≥ 1:50

A clear, yellow-green fluorescence is visible.

A positive reaction can show different patterns of nuclear and/or cytoplasmic apple green fluorescence, but any pattern of nuclear apple green fluorescence observed at 1:50 dilution is to be called positive.

“Homogeneous pattern”: Seen as homogeneous or diffuse green fluorescence of the whole nucleus due to autoantibodies to native DNA histones and/or DNP (deoxyribonucleoprotein). The chromosomes of the mitotic cell (dividing cells) are important indicators of a homogeneous pattern because they will stain as irregularly shaped masses with more intensely stained outer edges.

“Speckled pattern” (most common)! Cells not in division (non-mitotic) will show uniform “true speckled” green fluorescence patterns seen in sera with centromere antibodies. The chromosomal area of mitotic cells will not be stained; the cytoplasm of them shows a few speckles.

“Nucleolar pattern”: Seen as homogeneous, clumped or speckled staining of the nucleolus, often associated with a dull, homogeneous fluorescence in the rest of the nucleolus. In the mitotic cells the chromosomes will be negative.

“Peripheral pattern”: Seen as predominant staining of the nucleoli periphery.

Marginal fluorescence pattern 1:25

A weak, yellow-green fluorescence (1+) is visible.

Negative fluorescence pattern < 1:25

No yellow-green fluorescence visible.

Images are shown at <http://www.megacor.at>

EXPLANATION OF SYMBOLS

- Store at 2–8°C – see label
- For veterinary use only
- In vitro* diagnosticum
- Follow instructions for use precisely
- Expiry date – see label
- Lot number

! Do not use test-kit components from different kits, lot numbers or beyond stated expiry date.

