

## Gebrauchsinformation BIOGNOST® ANTIKÖRPER Nachweis



Nachweis von IgG, IgM und IgA ANTIKÖRPERN in humanem Serum mit INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ

Testdauer: ca. 90-120 min

### BESTIMMUNGSGEMÄßER GEBRAUCH

Der Biognost® IFT ist ein indirekter Immunfluoreszenztest für die qualitative und/oder semi-quantitative Bestimmung von Antikörpern in humanem Serum. Der Biognost® IFT ist zum Einsatz in der in vitro Diagnostik bestimmt.

### TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der klassischen Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Die Substratobjektträger sind mit Antigen beschichtet. Im ersten Schritt wird Patientenserum auf den Objektträger aufgebracht und inkubiert. Falls im Serum Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen vorhanden sind, werden diese gebunden. Unspezifische Antikörper, sonstige Proteine usw. werden durch einen Waschschriff entfernt. Um eine Beschädigung oder das Ablösen des Antigens zu vermeiden, darf während des Waschens nicht gerührt werden. Nach Auftragen des entsprechenden FITC markierten Antihumanimmunglobulins (Konjugat) und erneuter Inkubation im zweiten Schritt wird nochmals gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Der Komplex Antigen / humane Antikörper / Konjugat ist dann unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-500facher Vergrößerung sichtbar.

Beim Nachweis von IgM und/oder IgA Antikörpern wird ein Trennsystem (Biosorb®) zur Absorption von IgG und Rheumafaktoren dem ersten Schritt vorgeschaltet.

Enthält das zu untersuchende Serum keine Antikörper gegen das entsprechende Antigen, so unterbleibt die Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe. Unter dem Mikroskop sind dann auch keine spezifischen Fluoreszenzmuster beobachtbar.

### GRENZEN DER METHODE

Die Nachweise mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik weisen qualitativ die jeweiligen Antikörper nach. Der individuelle Antikörpertiter eines Patienten kann nicht als Maß für die Schwere der Erkrankung gesehen werden, da Antikörper von verschiedenen Patienten unterschiedliche Affinitäten aufweisen können. Aber ein Titeranstieg auf das 2-Fache bei Testwiederholung nach 10-14 Tagen deutet auf ein akutes Krankheitsgeschehen hin, was eine absolute Standardisierung der Ergebnisse schwierig macht. Die (theoretisch) optimale Breite des Antigenangebots ist der größte Vorteil dieser Nachweismethode. Indirekte Immunfluoreszenztests sind gute Screening Tests. Durch den Einsatz positiver Kontrollen, bei denen die Titer angegeben sind, ist eine semiquantitative Aussage möglich. Das Testergebnis sollte nicht als alleinige Basis zur Beurteilung des klinischen Bildes verwendet werden, es sollte immer im Gesamtzusammenhang (klinische Symptomatik, Zeitpunkt der Probenahme, andere Laborwerte, Referenzbereich Bios und/oder eigener Referenzbereich etc.) und in Kombination mit anderen verfügbaren Patientendaten gesehen werden.

### BIOGNOST® REAGENZIEN

Die Biognost® Nachweissysteme sind als Testkit oder Einzelkomponenten erhältlich:

**Substratobjektträger:** beschichtet mit dem jeweiligen Antigen.

**Positive Kontrolle:** stabilisiertes Humanserum, enthält Antikörper gegen das jeweilige Antigen, gebrauchsfertig.

**Negative Kontrolle:** stabilisiertes Humanserum, enthält keine mit der Immunfluoreszenztechnik nachweisbaren Antikörper, gebrauchsfertig.

**Konjugat:** mono- oder polyspezifisches Antihumanimmunglobulin, mit oder ohne Evans blue Gegenfärbung, gebrauchsfertig.

**Sonstige Komponenten:**

**PBS Puffer:** leicht lösliche PBS Puffer Festsubstanz zur Herstellung von 500 ml bzw. 1000 ml Pufferlösung; enthält 10 mM NaPhosphat, 150 mM NaChlorid, pH 7,5.

**Einschlussmedium, Saugpapierschablonen, Deckgläser.**

### ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Reaktionsgefäße zur Herstellung der Verdünnungsreihen

Pipetten (Bereich 1-1000 µl)

Vortex Mischer

Messkolben (500 ml bzw. 1000 ml) zur Herstellung des Phosphatpuffers

Destilliertes oder demineralisiertes Wasser

Feuchte Kammer

Brutschrank (37°C) für die IgM/IgA Bestimmung bei Viren und intrazellulären Keimen (Bartonella, Ehrlichia)

Färbetröge (möglichst groß)

Spritzflasche für PBS Puffer

Kurzzeitmesser

Dunkelfeld Fluoreszenzmikroskop mit trockenem Objektiv (ohne Immersionsöl zu benutzen) mit Filtern, für eine Anregungswellenlänge von 450-490 nm und eine Emission von 560-590 nm. Für eine höhere Empfindlichkeit ist ein Auflichtmikroskop einem Durchlichtmikroskop vorzuziehen.

### LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Objektträger, Kontrollen, Konjugate und Sorbentien müssen bei der jeweils auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Die Objektträger sind weiterhin wegen der Austrocknungs- und Denaturierungsgefahr im geschlossenen Aluminiumbeutel, also luftdicht verschweißt, zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Reagenzien **ungeöffnet** bis zum Verfalldatum haltbar. Nach Ablauf des Verfalldatums sind sie nicht mehr zu verwenden.

Nach Anbruch müssen die flüssigen Reagenzien wieder gut verschlossen und bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Sie sind nach der Erstöffnung schnellstmöglich zu verbrauchen. Das Verfalldatum einer Charge garantiert im Fall geöffneter

flüssiger Reagenzien nicht „die Haltbarkeit bei Wiederverwendung“. Die Substratobjektträger können nicht wiederverwendet werden. Sie müssen nach der Öffnung des Aluminiumbeutels komplett verbraucht werden.

Die PBS Puffer Festsubstanz ist bei Raumtemperatur und darunter **ungeöffnet**, d.h. im Aluminiumbeutel luftdicht verschweißt, unbegrenzt haltbar. Einschlussmedium, Saugpapierschablonen und Deckgläser sind bei Raumtemperaturlagerung oder niedrigerer Temperatur ebenfalls unbegrenzt haltbar. Das Verfalldatum auf dem Etikett dient beim PBS Puffer, Einschlussmedium sowie bei den Saugpapierschablonen und Deckgläsern nur der Organisation der Lagerhaltung. Angesetzte PBS Pufferlösung (pH 7,5) ist am selben Tag zu verbrauchen, da sie kein Konservierungsmittel enthält. Bei Verwendung am nächsten Tag muss sie zwischenzeitlich bei 5-10°C verschlossen gelagert werden. PBS Pufferlösungen mit Schlieren-, Flocken- oder Trübungsbildung bzw. Farb- oder pH-Wert-Änderung sind zu verwerfen.

Bitte informieren Sie sich auch auf unserer Biosite®: [www.bios-world.com/Aktuelles/Wichtig](http://www.bios-world.com/Aktuelles/Wichtig) zu wissen: Laufzeiten von IVD gelten nur bedingt.

### SICHERHEITSHINWEISE

1. Alle Kits und Reagenzien sind ausschließlich für die in vitro Diagnostik bestimmt.
2. Alle humanen Seren, die zur Herstellung der im Punkt INHALT aufgeführten Zubereitungen aus humanen Seren (Kontrollen) verwendet wurden, sind potentiell infektiös. Sie sollten mit der entsprechenden Vorsicht verwendet werden.
3. Kontrollen, Konjugate und Einschlussmedium enthalten 0,09% Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Das Verschlucken und Haut- bzw. Schleimhautkontakt ist zu vermeiden. Natriumazidhaltige Reagenzien dürfen nicht mit kupfer- oder bleihaltigen Gegenständen in Verbindung gebracht werden (Bildung explosiver Salze).
4. Einige Konjugate enthalten Evans blue (auf dem Etikett angegeben). Evans blue könnte karzinogen sein (der Schweizer Giftklasse 1\* zugeordnet). Vermeiden Sie deshalb das Verschlucken sowie den Hautkontakt mit Evans blue haltigen Lösungen.
5. Sicherheitsbestimmungen der Berufsgenossenschaft und des jeweiligen Institutes (Labors) bezüglich biogefährdenden, giftigen und reizenden Stoffen sind strikt zu beachten (siehe Aushänge, Laborjournal, Sicherheitsbelehrung sowie die aus Zertifizierung bzw. Akkreditierung resultierenden Arbeitsvorschriften).
6. Die aktuellen Regeln der guten Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP) sollten immer beachtet werden.
7. Nach der Testdurchführung sind alle im Test benutzten Reagenzien und Seren entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen und der Arbeitsplatz zu desinfizieren.

### UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Als Untersuchungsmaterial kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Bei 5-10°C ist Serum/Plasma ca. 1 Woche haltbar. Für eine Lagerung und Mehrfachnutzung sollten Seren/Plasmen in kleinere Portionen (> 50 µl) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei ≤ -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von größeren Mengen an Seren/Plasmen kann zur Bildung von Proteinaggregaten sowie zum Abbau von Serum/Plasmabestandteilen führen und ist deshalb zu vermeiden. Da Azid bei den durchzuführenden Untersuchungen nicht stört, wird Serum/Plasma aber auch durch Zugabe von 0,09% Azid für längere Zeit (≥ 1 Jahr) im Kühlschrank in der Regel ohne Analytverlust lagerfähig.

Beim IgM bzw. IgA Nachweis wird eine Vorbehandlung des Patientenserums notwendig, um Störeffekte durch Rheumafaktoren, welche das Vorhandensein von IgM vortäuschen können, und IgG Antikörper, welche die IgM/IgA Bindung kompetitiv hemmen können, zu vermeiden. Die Trennung der Antikörperklassen kann mit dem von Bios® erhältlichen gebrauchsfertigen Trennsystem Biosorb® durchgeführt werden (siehe Trennsysteme). Hierfür werden 1 Teil Patientenserum und 4 Teile Biosorb® zusammenpipettiert und durchmischt. Die Mischung lässt man 15 Minuten reagieren. Diese 1:5 Verdünnung kann dann unverdünnt oder mit PBS Puffer weiterverdünnt direkt in den Test eingesetzt werden. **Ein Zentrifugationsschritt ist nicht erforderlich.**

Obwohl für die IgG/IgM Trennung optimiert, kann Biosorb® auch zur Probenvorbehandlung bei IgA Bestimmungen verwendet werden. IgG Antikörper werden aus der Probe entfernt, während IgM und der größte Teil der IgA Antikörper in der Probe verbleiben. Durch die Vorbehandlung werden die Proben verdünnt. Der Verdünnungsfaktor von 1:5 ist bei der Herstellung der Testverdünnungen für den IgM bzw. IgA Nachweis zu berücksichtigen. Die Trennung sollte unmittelbar vor dem Testansatz erfolgen.

### QUALITÄTSKONTROLLE UND FEHLERSUCHE

Eine positive Kontrolle für jeden zu interpretierenden Parameter und eine negative Kontrolle sollten bei jedem Testlauf mitgeführt werden.

Soll im Anwenderlabor die Funktionstüchtigkeit der Tests, d.h. die Sensitivität und Spezifität überprüft werden, wird die positive Kontrolle verdünnt, um den auf dem Etikett der positiven Kontrolle angegebenen Titer zu reproduzieren. Auch bei nicht eindeutigen Laborergebnissen kann das Testkonzept durch Reproduktion des Titers der positiven Kontrolle überprüft werden. Zeigen die Ergebnisse der Kontrollen nicht die erwarteten Werte, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Kann der auf dem Etikett angegebene Titer ( $\pm 1$  bis 2 Verdünnungsstufen) nicht reproduziert werden, so sollte überprüft werden, ob ausschließlich Biognost® Testreagenzien im Testansatz verwendet wurden oder z.B. anderes Konjugat, andere Deckgläser, anderes Einschlussmedium, nicht frisch angesetzter Biognost® Puffer. Weiterhin muss überprüft werden, ob das benutzte Fluoreszenzmikroskop einwandfrei funktioniert; mögliche Fehlerquellen sind ölverschmutzte Objektive, Dejustierung oder eine zu schwache Lampe. Desweiteren ist zu prüfen, ob die Reagenzien richtig gelagert wurden bzw. bereits verfallen sind, ob die im Testansatz verwendete feuchte Kammer feucht genug ist, ob der Objektträger mit einem Filzstift beschriftet wurde (bitte nur harten Bleistift benutzen) etc. Auch sollten die Reagenzien auf keinen Fall durch Erhitzen auf Raumtemperatur gebracht werden.

Konjugate können durch die Pufferleerwertkontrolle auf eventuelle unspezifische Anfärbung des Substrates überprüft werden: Analog den Kontrollen oder den vorverdünnten Patientenserum wird auf eine Auftragstelle die entsprechende Menge PBS Pufferlösung aufgetragen und der üblichen Testdurchführung unterworfen.

Die Sensitivität und Spezifität der Biognost® Tests unterliegt einer ständigen Überwachung durch das Bios® Kontrolllabor. Bios® setzt alle verfügbaren WHO oder anderweitig definierten Kontroll- bzw. Serumstandards zur Teststandardisierung ein.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Die Biognost® Objektträger, Kontrollen und das Konjugat sind gebrauchsfertig, sobald sie sich auf Raumtemperatur erwärmt haben (ca. 5 min). Die Kontrollen und das Konjugat sind also unverdünnt zu benutzen.

Hinweise für die Benutzung von Biosorb® als IgG/IgM (IgG/IgA) Trennsystem sind im Punkt INHALT und in der Gebrauchsinformation Best.Nr. S0001tid zu finden. Die Biognost® Kontrollen sind soweit notwendig vortrennt. Sie sollen weder einer Trennung in Bezug auf Immunglobulinklassen noch gegebenenfalls einer Absorption unterzogen werden.

Die Biognost® Objektträger sind gebrauchsfertig fixiert. Die Substrate können bei einem weiteren Fixierschritt im Anwenderlabor zerstört werden.

Vor Beginn des Testansatzes sind die Seren entsprechend den Vorgaben (Screeninguntersuchung, Titration) mit PBS Pufferlösung oder einer Lösung aus PBS mit 1% Rinderserumalbumin zu verdünnen. Gebräuchliche Verdünnungsreihen sind: 1:2; 1:4; 1:8 etc. oder 1:5; 1:10; 1:20 etc.

Das Pipettierschema des Tagesansatzes muss vor Beginn des Testansatzes schriftlich in einem dafür vorgesehenen Formular festgelegt werden. Dieses Formular ist die Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse und deren Dokumentation.

1. Objektträger vorsichtig aus der Alu-Verpackung nehmen (Einkerbung zum Aufreißen ist vorgestanzt!), ohne die Auftragstellen zu berühren. Zum Beschriften der Objektträger nur harten Bleistift, niemals Filzstift verwenden.
2. Kontrollen und vorverdünnte Patientenserum auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle werden ca. 15-50 µl benötigt).
3. Objektträger 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.

### **Ausnahme: Viren und intrazelluläre Bakterien (Bartonella, Ehrlichia):**

In feuchter Kammer inkubieren, dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden:

**IgG Nachweis:** 30 min bei Raumtemperatur

**IgM/IgA Nachweis:** 30 min bei 37°C oder 60 min bei Raumtemperatur

Die oben aufgeführten Zeit- und Temperaturangaben bezüglich der Inkubation bei den verschiedenen Immunglobulinen (IgG, IgM und IgA) ermöglichen optimales Arbeiten bei jedem Parameter (kürzest mögliche Zeit, minimaler Aufwand etc.). Allerdings können diese Vorteile nur genutzt werden, wenn ausreichend Seren für die verschiedenen Untersuchungen (z.B. ausreichend IgG und ausreichend IgM Untersuchungen) vorliegen, um mindestens jeweils einen Objektträger zu füllen. Soll bzw. muss jedoch z.B. ein einziges Serum auf IgG, IgM und ggf. auch noch auf IgA untersucht werden, ist die oben aufgeführte Unterscheidung bei der Sereninkubation nicht mehr sinnvoll. Vielmehr sollte der IgG, IgM und der IgA Nachweis in diesem Fall auf einem Objektträger angesetzt werden. Der Serumininkubationsschritt richtet sich dabei nach den höchsten Anforderungen (längste Zeit und höchste Temperatur). So wird sichergestellt, dass optimale IgM Ergebnisse erhalten werden. Die Ergebnisse für IgG und IgA werden dadurch nicht beeinträchtigt, außer dass der etwas höhere Hintergrund, welcher sonst nur bei IgM Nachweisen zu beobachten ist, auch hier auftreten kann.

4. Objektträger feuchter Kammer entnehmen, Serum- bzw. Flüssigkeitsüberschuss mit PBS vorsichtig abspülen (Strahl aus Spritzflasche dabei keinesfalls direkt auf die Auftragstelle richten!).
5. 2x 5 min in PBS Puffer waschen (nach 1x 5 min Wechsel in neuen Puffer); möglichst große Färbetröge benutzen, und den (die) Objektträger im PBS Puffer nicht bewegen bzw. nicht rühren.
6. Objektträger mit Saugpapierschablonen trocknen, aber Substrat dabei nicht trocken werden lassen und deshalb sofort anschließend
7. das entsprechende Konjugat auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle ca. 15-50 µl). Ein Tropfen aus Biognost® Konjugatflaschen entspricht ca. 25 µl.
8. Objektträger lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei speziell vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.
9. Schritte 4-6 wiederholen und dann sofort
10. zwei bis drei kleine Tropfen Einschlussmedium auf dem Objektträger verteilen, Präparat luftblasenfrei mit Deckglas versehen und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten.

Gegebenenfalls übergelaufenes Einschlussmedium vorsichtig mit einem mit PBS angefeuchteten Papiertuch entfernen, um ein Ankleben am Mikroskopisch bzw. im Präparatebehälter zu vermeiden.

Langzeitkonservierung der Präparate: Versiegeln der Kanten mit farblosem Nagellack, Lagerung bei ≤ -20°C bis zu mehreren Jahren.

Der Testansatz kann auch automatisiert durchgeführt werden.

**Liquorproben** sollten grundsätzlich immer unverdünnt sowie 1:2, 1:4 und 1:10 etc. verdünnt getestet werden. Die Verdünnung von Liquorproben ist entweder mit PBS Pufferlösung oder einer Lösung aus PBS mit 1% Rinderserumalbumin durchzuführen.

## BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Die Präparate werden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-500fachen Vergrößerung beurteilt (Filterbereich 450-490 nm). (Überblick bei 100 facher Vergrößerung). Nicht zu lange ein und dasselbe Gesichtsfeld mustern, sondern in rascher Folge möglichst viele Gesichtsfelder auswerten, um das Ausbleichen des Präparats zu vermeiden. Die Präparate sollen sofort nach der Testdurchführung abgelesen werden. Wenn das nicht möglich ist, müssen sie kühl, dunkel und vor dem Austrocknen geschützt in Präparatemappen gelagert werden. Ein Testansatz kann nur dann bewertet werden, wenn die mitgeführten Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigen.

### **Fluoreszenzmuster:**

Zur Auswertung muss die Anfärbung der jeweiligen von Nachweis zu Nachweis unterschiedlichen Substratmuster bzw. der jeweiligen Erreger beurteilt werden. Detailliertere Informationen für die Bewertung und Interpretation der entsprechenden Nachweise sind in den parameterspezifischen Gebrauchsinformationen zu finden.

Wir weisen darauf hin, dass beim Immunfluoreszenztest die IgM-Muster grundsätzlich schwächer sind als die IgG-Muster. Je nach Serum, welches der IgM-Kontrolle zugrunde liegt, können die Fluoreszenzmuster auch variieren. IgM-Kontrollen können bzgl. des Titers schon deswegen an die Grenzen stoßen, weil sie auf verschiedenen Substratchargen, z.B. bei einem angegebenen Titer von 4, gerade noch im unverdünnten Zustand ein positives Ergebnis geben. Abweichungen von 1 bis 2 Titerstufen sind jedoch methodenbedingt akzeptabel.

**Positiv:**

Die spezifische Fluoreszenz ist eine helle apfelgrüne Farbe mit unterschiedlicher Intensität: von 1+ schwach; über 2+ mäßig; 3+ stark bis 4+ brilliant.

**Negativ:**

Fluoreszenzen mit geringerer Intensität als 1+ werden als negativ beurteilt. Gelbliche oder dunkelgrüne Fluoreszenzen sind unspezifisch und dürfen nicht berücksichtigt werden.

**Titer:**

Der Titer ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, bei der noch mindestens eine 1+ Fluoreszenz zu sehen ist. Beispiel: Wird die 1:80 Verdünnung mit 1+ positiv bewertet, die 1:160 Verdünnung aber negativ, so ist der Titer 80.

**Interpretation der Ergebnisse:****1. Referenzbereich und Spezifität:**

Referenzbereiche können bei der Befundinterpretation eine Orientierungshilfe darstellen. Referenzbereiche geben an, welche Messwerte (Titer, Extinktion) bei gesunden Normalpersonen zu erwarten sind. Referenzbereiche sind eine statistische Größe und können in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs (Alter, Geschlecht, Geographie) sowie in Abhängigkeit von der jeweiligen Messmethode differieren. Zwischen Kranken und Gesunden besteht messtechnisch generell keine scharfe Grenze, vielmehr ist der Übergang meist fließend.

Definitionsgemäß umfasst der Referenzbereich nur 95% des gemessenen Konzentrationsbereichs. 5% der gesunden Personen des untersuchten Kollektivs liegen demnach außerhalb des Referenzbereiches ohne krank zu sein.

Ein innerhalb des Referenzbereiches liegendes Laborergebnis schließt daher eine Erkrankung nicht sicher aus. Ein außerhalb liegendes Ergebnis ist für sich alleine kein zwingender Beweis für eine Krankheit.

**Untersuchung von gesunden Blutspendern:**

Basierend auf der Auswertung von gesunden Blutspendern im Alter zwischen 22 und 40 Jahren aus allen Teilen Deutschlands sowie Belgien, Dänemark, Frankreich, Griechenland, Großbritannien, Holland, Irland, Italien, Luxemburg, Polen, Portugal, Österreich und Spanien wurden für die Biognost® Antikörper Immunfluoreszenztests Referenzbereiche ermittelt, die in den parameterspezifischen Gebrauchsinformationen zu finden sind.

**LITERATUR**

1. Weller T.H., Coons A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varizella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 1954, 789-794.
2. Riggs J.L., Siewald R.J., Burckhalter J.H., Downs C.M., Metcalf T.G.: Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum. Am. J. Pathol. 34, 1958, 1081-1097.