

Instrucciones de empleo BIOGNOST® IFA

Detección de ANTICUERPOS IgG, IgM e IgA en suero humano con INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Duración total del test: 90-120 minutos

PROPOSITO DEL TEST

Biognost® IFA es un test de detección de anticuerpos por fluorescencia indirecta para la determinación cualitativa y/o semicuantitativa de anticuerpos en el suero humano. Biognost® IFA debe utilizarse como apoyo en el diagnóstico in vitro.

PRINCIPIO DEL TEST

El test se basa en el método clásico de la inmunofluorescencia indirecta. Los portas con sustrato están impregnados con antígeno. En el primer paso, los sustratos fijados al porta se incuban con sueros de pacientes. En caso de contener anticuerpos en el suero contra el correspondiente antígeno, éstos se fijarán. Los anticuerpos no específicos, demás proteínas, etc. se eliminan por medio de un lavado. Con el fin de evitar un perjuicio o un desprendimiento de los sustratos fijados no debe removerse los portas durante el proceso de lavado. Tras aplicar el correspondiente conjugado FITC y nueva incubación (segundo paso) se vuelve a lavar con el fin de eliminar el conjugado sobrante. El conjunto - antígeno / anticuerpos humanos / conjugado - es entonces visible bajo un microscopio fluorescente, de aumento 400 – 500 veces.

Para la detección de anticuerpos IgM y/o IgA debe realizarse un paso previo a lo antes mencionado para la absorción de IgG y factores reumatoides (Biosorb®).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La inmunofluorescencia indirecta es para la detección de los diferentes anticuerpos presentes en los pacientes. Dada la afinidad de los anticuerpos para el test el/los antígenos pueden variar según el paciente, los resultados son difíciles de estandarizar en términos absolutos y unos títulos de anticuerpos no necesariamente reflejan la severidad de la enfermedad a investigar. Por otro lado, y debido a que esta técnica se basa en portas impregnados con sustrato con el rango óptimo (teóricamente) de los antígenos relevantes hace que la inmunofluorescencia indirecta sea ideal para "screening" de anticuerpos.

Donde existan controles positivos con títulos de anticuerpos conocidos, los resultados se pueden evaluar semicuantitativamente. No obstante, debe recordarse que para la valoración de la enfermedad no solo deben basarse en estos resultados. Los resultados siempre deben interpretarse en un contexto general (síntomas clínicos, cuadro clínico, signos, otros análisis serológicos o biopsia, características específicas del fabricante del test, referencias internas para el test en particular).

MATERIALES NECESARIOS ADICIONALMENTE

Tubos de reacción adecuados para la elaboración de las series de dilución.

Pipetas (rango 1-1000 µl)

Mezclador Vortex

Matraz aforado de 500 ml ó 1000 ml para la preparación del tampón.

Agua destilada o desionizada

Cámara húmeda para incubación

Incubadora (37°C)

Bandejas de tinción

Frasco lavador para el tampón

Cronómetro

Microscopia de campo oscuro con filtros para una longitud de onda de excitación 450-490 nm y emisión 560-590 nm (para una mejor sensibilidad, debería utilizarse preferentemente ondas de excitación en lugar de ondas de excitación por transmisión). No utilizar aceite de inmersión.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los portas, controles, conjugados Biosorb® y el medio de oclusión deberán almacenarse a la temperatura indicada en la etiqueta correspondiente (5-10 °C 20 °C). Los portas están, además, protegidos contra desecación y desnaturalización, mediante soldadura hermética, por lo que se recomienda almacenar dentro de la bolsa de aluminio. Los controles, conjugados y portas son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta y siguiendo estrictamente las recomendaciones. No deben emplearse los reactivos transcurrida la fecha de caducidad. A temperatura ambiente y herméticamente cerrado, el tampón PBS en polvo tiene una caducidad ilimitada. También el papel absorbente y los cubreobjetos tienen una caducidad ilimitada si son almacenados tanto a temperatura ambiente como refrigerados. La fecha indicada en la etiqueta para el tampón PBS, papel absorbente así como cubreobjetos es solo para efectos de organización del almacén.

La solución preparada del día (pH 7,5) debe gastarse el mismo día, dado que no contiene conservante alguno. Guardada y tapada entre 4 y 8 °C podría utilizarse al día siguiente. Debe ser descartado el uso de PBS con formación de precipitado en flocas, defectos ópticos o turbio así como con un cambio de color o valor pH.

INDICACIONES DE SEGURIDAD

1. Todos los sueros humanos que se emplean para la elaboración de los controles han sido testados contra los anticuerpos de HBsAg e HIV y determinados como negativos. Dado que no se puede excluir del todo una infección, deben tratarse con las medidas de seguridad correspondientes.
2. Los reactivos líquidos, tales como controles, conjugadores, etc., contienen 0,09% azida de sodio. Azida sódica es tóxica. No inhalar y evitar cualquier contacto con la piel y mucosas. Los reactivos que contengan azida sódica no deben entrar en contacto con objetos tubos de plomo o cobre ya que puede formar azidas metálicas explosivas
3. Algunos conjugados contienen el colorante Azul de Evans (indicado en la etiqueta). El Azul de Evans puede ser cancerígeno (primera categoría según la clasificación Suiza de venenos). Aunque la concentración de colorante es muy baja (máx. 0,2 mg/ml), debe tenerse cuidado de no inhalar estos y evitar cualquier contacto con la piel.
4. Se deben cumplir todas las disposiciones de seguridad correspondientes a materiales venenosos e irritantes, oficialmente establecidas.
5. Tener en cuenta las regulaciones actuales de Good Laboratory Practice (GLP) – (Buenas Prácticas de Laboratorio).
6. Tras la realización de los tests deben eliminarse los reactivos y sueros empleados según las disposiciones legales correspondientes.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tanto el suero como el plasma son aptos para el examen. Las muestras son estables durante 1 semana a una temperatura de 4 –8 °C. Para un almacenamiento más prolongado y un empleo múltiple deberán prepararse alícuotas (50 µl) y congelarse a –20°C. Una congelación y descongelación repetitiva de cantidades mayores de sueros puede favorecer la formación de agregaciones proteínicas así como la merma de componentes del suero o plasma y por lo tanto debe evitarse. Las muestras de suero o plasma deben estabilizarse con 0,09% de azida sódica. Sin embargo puede interferir en los análisis a realizar con el suero (como sucede lamentablemente con la peroxidasa en ELISA). Este tipo de muestras pueden conservarse por periodos prolongados (hasta 1 año) en refrigerador a una temperatura de 5-10 °C sin pérdida de propiedades analíticas.

Para la determinación de IgM o IgA se recomienda un tratamiento previo del suero, con el fin de eliminar efectos perturbadores como factores reumatoides, los cuales pueden simular la presencia de IgM así como anticuerpos IgG, los cuales pueden inhibir el enlace IgM/IgA. La separación de las clases de anticuerpos se puede realizar mediante el sistema de separación Biosorb®, listo para empleo de Bios®. Aunque Biosorb® optimiza la separación IgG/IgM, también puede emplearse para el tratamiento previo de muestras para la determinación de IgA. Los anticuerpos IgG son eliminados de la muestra, mientras que los IgM y la mayor parte de los anticuerpos IgA permanecen. Por medio del tratamiento previo, las muestras de diluyen. Usar el factor de dilución 1 : 5 para determinación de IgM o IgA y debe tenerse en cuenta en la preparación final de las diluciones.

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® and Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

CONTROL DE CALIDAD Y BÚSQUEDA DE ERRORES

En cada serie debe incluirse un control positivo y negativo para cada parámetro. Para la validación del test es necesario que cada control demuestre las reacciones esperadas.

El título obtenido de los controles positivos debe coincidir con el valor indicado en la etiqueta ± 1 a 2 pasos de dilución. Si no fuera así, comprobar lo siguiente: ¿Son algunos de los componentes utilizados en este test no originales de Bios® (Ej. Cubre-porta, medio de montaje, etc.)? ¿Se ha preparado el tampón Biognost® en el día? ¿Se conocen algunas deficiencias en el funcionamiento del microscopio de fluorescencia? ¿Tales como las lentes del objetivo manchadas de aceite, deficiente ajuste, iluminación pobre? ¿Se han almacenado los portas y los reactivos Biognost® correctamente? ¿Ha caducado algún componente? ¿La cámara húmeda de incubación estaba suficientemente húmeda? (nunca dejar que se seque durante el procesamiento del porta). ¿Se han rotulado los portas correctamente, es decir con lápiz? Los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente por sí solos, nunca por calentamiento.

Cualquier fijación no específica del conjugado debe ser identificada incluyendo un blanco con tampón en cada pasada, es decir en lugar de una muestra se llena un pocillo con tampón y se procede con el test.

REALIZACIÓN DEL TEST

Antes de comenzar con el test permitir que los portas, controles y conjugados Biognost® alcancen temperatura ambiente (aprox. 5 minutos). Tanto los controles como los conjugados están listos para usar. No requieren diluciones adicionales.

Las directrices de uso de Biosorb® como separación de IgG/IgM (IgG/IgA) y en consecuencia la dilución final de la muestra ver el punto COMPONENTES y a las instrucciones de empleo Cat.No. S0001ties.

Los controles Biognost® ya han sido separados y no deben someterse ni a una separación de las clases de inmunoglobulinas ni, dado el caso, efectuar una absorción. Los portas Biognost® vienen ya fijados con antígeno y listos para empleo. Los substratos pueden destruirse con otra fijación.

Consultar las instrucciones de empleo u hoja de características para cada parámetro la dilución screening adecuada, o sea, la dilución para la determinación del título. Antes del test, las muestras de suero deben haberse diluido apropiadamente con PBS, con o sin suero de albúmina bovina al 1%.

Primeramente, hay que establecer en un formulario la distribución e identificación de los especímenes y controles. Este formulario es básico para la interpretación y documentación de los resultados.

1. Sacar con cuidado el porta de la bolsa de aluminio (abrir por la muesca existente), teniendo cuidado de no tocar las áreas de aplicación. Para el marcado de los portas usar solo lápiz duro nunca rotulador.

2. Aplicar los controles y sueros en las áreas de aplicación, cubriendo bien el pocillo, según el tamaño del pocillo entre 15 y 50 μ l.

3. Incubar el porta en cámara húmeda:

Determinación de IgG/ poliespecífico: min. 30 minutos a temperatura ambiente.

Determinación IgM/IgA: min. 30 minutos a temperatura ambiente.

Determinación IgM/IgA de gérmenes intracelulares (virus, bacterias intracelulares): 30 minutos a 37° C ó 60 minutos a temperatura ambiente.

Proteger los portas de la luz directa y proximidad de calefactores.

4. Extraer el porta de la cámara húmeda y eliminar aclarando con cuidado con PBS. (No dirigir el chorro directamente al pocillo).

5. Lavar el porta 2 veces 5 minutos en PBS (tras 5 minutos cambiar a otro recipiente con PBS nuevo); utilizar a ser posible bandejas de tinción grandes. No mover el porta dentro del PBS.

6. Secar los portas con papel absorbente, sin que el substrato llegue a secarse e inmediatamente a continuación

7. Aplicar el conjugado apropiado a cada aplicación cubriendo completamente los pocillos (según el tamaño del pocillo de 15 a 50 μ l). 1 gota de conjugado de la botella Biognost® contiene aproximadamente 25 μ l.

8. Incubar el porta 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda de incubación. Proteger porta de la luz directa y proximidad de calefactores.

9. Repetir los pasos 4 a 6. No enjuagar el porta con agua destilada (ni desionizada), pero si inmediatamente.

10. Repartir 2-3 gotas de medio de montaje sobre el porta y cubrir con el cubre-objetos sin que se formen burbujas. Eliminar el medio de montaje excesivo con un papel humedecido en tampón, con el fin de evitar que se peguen en la mesa del microscopio o carpeta de portas. Se recomienda una interpretación inmediata bajo el microscopio fluorescente. Si esto no fuera posible, deberán guardarse en lugar oscuro y frío y protegidos contra la desecación (máx. 24 horas). Para tests EBNA y Ac gliadin, ver nuestras hojas de instrucciones especiales.

VALORACIÓN E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los portas se evalúan bajo un microscopio fluorescente con un aumento de entre 400 y 500 veces (perspectiva general con aumento de 100 veces). No concentrarse mucho rato en la misma área, es preferible desplazarse por toda la preparación, con el fin de evitar pérdidas de fluorescencia.

Un test sólo se puede evaluar, si los controles muestran los resultados esperados.

Informaciones más detalladas para la evaluación e interpretación de las correspondientes determinaciones, pueden extraerse de las instrucciones de empleo o bien de la hoja de características de parámetros específicos.

Patrones de fluorescencia:

Para la evaluación se deberá valorar la coloración de las estructuras tisulares del substrato o de los patógenos, comparando con patrones que deben establecerse.

Evaluación positiva:

La fluorescencia específica es de un color verde manzana con una intensidad generalmente de 1+ (débil), más de 2+ (regular), 3+ (brillante), hasta 4+ (muy brillante)

Evaluación negativa:

Fluorescencias con intensidades inferiores a 1+ se valorarán negativas. Fluorescencias amarillentas o verde oscuras son sin especificar y no deben ser tenidas en cuenta.

Título:

El título es el valor recíproco de la dilución mayor, en la cual se puede observar como mínimo una fluorescencia 1+. Ejemplo: en caso de valorarse una dilución 1:80 como positiva y una dilución 1:160 negativamente, el título sería pues de 80.

BIBLIOGRAFÍA

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