

Istruzioni per l'uso BIOGNOST® IFA

Rivelazione degli anticorpi di classe IgG, IgM e IgA nel siero umano con IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Tempo totale d'analisi: 90-120 minuti

FINALITÀ D'USO

Il Biognost® IFA è un metodo d'analisi in immunofluorescenza indiretta, per la determinazione qualitativa e/o quantitativa di anticorpi nel siero umano. Realizzato quale ausilio per la diagnostica in vitro.

PRINCIPI DELL'ANALISI

L'analisi è basata sul metodo classico dell'immunofluorescenza indiretta. I vetrini sono predisposti con un substrato antigenico; dapprima vi si deposita il siero del paziente, quindi si procede all'incubazione e gli anticorpi eventualmente presenti nel campione si legheranno all'antigene specifico sui vetrini. Le immunoglobuline non legate e gli altri elementi nel campione vengono rimossi lavando i vetrini con l'apposito tampone a corredo. Non agitare durante i lavaggi in quanto il substrato immobilizzato potrebbe essere danneggiato o asportato. Durante una seconda incubazione, gli anticorpi legatisi sono otticamente marcati con immunoglobulina anti-umana coniugata FITC (il coniugato). L'eccesso di coniugato è rimosso con un nuovo lavaggio dei vetrini. I complessi antigene/anticorpo umano/coniugato formati possono essere visualizzati con microscopio a fluorescenza con ingrandimento a 400/500X.

Se si desidera la rivelazione specifica di anticorpi, di classe IgM o IgA, i campioni devono essere trattati con l'adsorbente specifico (Biosorb®) per la rimozione delle IgG e del fattore reumatoide prima della loro dispensazione sui vetrini coattati.

LIMITI METODOLOGICI

La tecnica dell'immunofluorescenza indiretta è utilizzata per la determinazione di diversi anticorpi nei campioni dei pazienti. Poiché l'affinità degli anticorpi per l'antigene (i) in esame può notevolmente variare tra individuo ed individuo, i risultati dell'analisi sono difficili da standardizzare in assoluto e titoli anticorpali individuali non necessariamente riflettono la severità della patologia investigata. Di contro, poiché la tecnica è basata su un vetrino substrato che presenta (teoricamente) il campo ottimale dei pertinenti antigeni, l'immunofluorescenza indiretta è l'ideale per soddisfare esigenze di screening. Disponendo di controlli con titoli anticorpali noti, i risultati dell'analisi possono essere valutati semi quantitativamente. Si ricorda comunque agli utilizzatori che la definizione di una situazione clinica non dovrebbe essere basata su singoli risultati ma questi, dovrebbero essere sempre interpretati nel contesto delle relative informazioni generali. (es.: sintomi e segni clinici, tempo dal prelievo, altri risultati di laboratorio, caratteristiche fornite dal produttore dei componenti, valori di riferimento interni del laboratorio per l'esame in esecuzione nonché gli altri dati disponibili sul paziente.

REAGENTI BIOGNOST®

I reagenti Biognost® sono disponibili in kit o in componenti separati.

Vetrino di supporto: con adesivo il rispettivo antigene.

Controllo positivo: siero umano stabilizzato contenente anticorpi verso il rispettivo antigene, pronto all'uso.

Controllo negativo: siero umano stabilizzato non contenente anticorpi di classe (IgG, IgM, IgA), pronto all'uso.

Coniugato: immunoglobulina anti-umana mono o polispecifica, con o senza Blue Evans, pronta all'uso o concentrata; la diluizione di lavoro è indicata in etichetta:

Tampone PBS: in polvere facilmente solubile; per preparare 500 ml. o 1000 ml di soluzione tampone, pH 7.5, contenente 10 mM di fosfato di sodio + 150 mM cloruro di sodio.

Liquido di montaggio, cartine assorbenti, vetrini copri oggetto, istruzioni per l'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Contenitori appropriati per preparare diluizioni seriali dei campioni

Pipette di precisione e puntali per dispensare 1-1000 µl

Agitatore

Cilindro graduato da 500 o 1000 ml per preparare la soluzione salina di tampone fosfato

Acqua distillata o deionizzata

Camera di incubazione umidificata

Incubatore a 37 °C

Vaschette per il lavaggio dei vetrini

Bottiglia per la conservazione del tampone PBS

Cronometro

Microscopio a fluorescenza a campo scuro con filtro di eccitazione 450-490 nm e di emissione 560-590 nm (per una sensibilità ottimale, preferire un microscopio a luce incidente a uno a trasmissione). Non usare olio per immersione.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare i vetrini, controlli, coniugati e il Biosorb® alla temperatura specificata in etichetta. Per evitare l'essiccamento e la denaturazione degli antigeni coattati sui vetrini, gli stessi devono essere tenuti nelle apposite buste alluminate adeguatamente sigillate. Se conservati, secondo quanto raccomandato, i controlli, coniugati e vetrini sono stabili fino alla data di scadenza in etichetta. Non usare alcun componente se scaduto. Le bustine di tampone fosfato sigillate, il liquido di montaggio, le cartine assorbenti ed i vetrini coprioggetto conservati alla temperatura ambiente o inferiore non hanno scadenza. Questi quattro prodotti hanno comunque una data di scadenza in etichetta al solo scopo di facilitare un controllo di magazzino. Il tampone di lavaggio PBS (pH 7,5) dovrebbe essere preparato fresco il giorno dell'uso in quanto non contiene conservanti. Nel caso in cui rimangano avanzi di tampone e, si desidera utilizzarlo il giorno successivo alla preparazione, questo deve essere conservato adeguatamente chiuso a 5-10 °C. Scartare la soluzione di tampone PBS se torbida, appare colorazione, precipitati flocculati o se il pH è cambiato.

PRECAUZIONI PER LA SICUREZZA

1. Tutti i sieri umani utilizzati per la produzione dei controlli positivi e negativi riportati nella sezione COMPONENTI sono stati analizzati e risultano essere negativi per anticorpi HbsAg e HIV. Comunque questi reagenti devono essere considerati come potenzialmente infetti e manipolati con l'adeguata attenzione.
2. Tutti i reagenti liquidi, controlli, coniugati etc., contengono 0,09% di sodio azide; la sodio azide è velenosa. Non inalare ed evitare il contatto con la pelle e le mucose. L'azide contenuta nei reattivi non deve essere messa a contatto con oggetti contenenti rame o piombo, es. certe tubazioni di scarico, in quanto può portare alla formazione di azide metallica esplosiva.
3. Come specificato in etichetta, alcuni coniugati contengono blue Evans come contrastante. Il blue Evans viene considerato come possibile cancerogeno (classe 1* secondo le tabelle di tossicità svizzere). Sebbene la concentrazione sia molto bassa (Mass. 0,2 mg/dl), gli utilizzatori devono prestare attenzione a non inalare i coniugati ed evitare ogni contatto con la pelle.
4. Seguire e rispettare strettamente le direttive per la sicurezza in laboratorio dei rispettivi istituti (le guide di laboratorio, gli aggiornamenti, le istruzioni di sicurezza etc.).
5. Si raccomanda di seguire le attuali direttive definite da 'GLP' (Good Laboratory Practice).
6. Materiali e reagenti usati nell'analisi devono essere messi a rifiuto/eliminati in accordo con quanto disposto dalla legislazione vigente.

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

CAMPIONI E TRATTAMENTO

Per l'analisi si può usare siero o plasma. Il siero e il plasma sono stabili per una settimana se conservati a 5-10 °C. Se necessario, per una ripetizione dell'analisi o una più lunga conservazione, i campioni devono essere divisi in aliquote, congelati in azoto liquido e conservati alla temperatura di -20 °C o inferiore. Evitare di sottoporre campioni di siero o plasma a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento in quanto questo può causare l'aggregazione delle proteine e la degradazione di alcuni componenti del siero o plasma. I campioni, di siero o plasma, dovrebbero anche essere stabilizzati con azide 0,09%; questo trattamento non interferisce con l'analisi (l'azide potrebbe interferire ad esempio in tecniche ELISA basate sulla perossidasi). Questi campioni possono essere conservati a 5-10 °C per lungo tempo (fino ad 1 anno) senza perdita di analiti. Comunque, se sui campioni si devono eseguire analisi per la ricerca di anticorpi IgA o IgM, questi devono prima essere adeguatamente pretrattati onde evitare reazioni falsamente positive, dovute ad interferenza da fattore reumatoide o, falsamente negative, dovute alla competizione di legame al sito antigenico da parte delle IgG. La Bios® dispone per lo scopo di un sistema di separazione, pronto all'uso, denominato (Biosorb®). Anche se, specificatamente ottimizzato per la separazione delle IgG/IgM, questo sistema è utilizzabile per determinazioni di IgA.

Il Biosorb rimuove le IgG lasciando nei campioni le IgM e la maggior parte delle IgA. Durante questa procedura i campioni sono diluiti; il fattore di diluizione risultante per IgM e IgA è di 1:5 e dovrà essere considerato quando si prepara la diluizione finale per l'analisi.

CONTROLLO DI QUALITÀ E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Includere in ogni seduta e per ogni parametro sia il controllo positivo sia il negativo. A convalida delle analisi su ogni controllo devono essere riscontrate e confermate le reazioni attese.

Il titolo ottenuto per il controllo positivo deve confermare quello riportato in etichetta con tolleranza di ± 1 o 2 diluizioni. In caso contrario verificare quanto segue: Tutti i componenti usati siano stati forniti da Bios® (es.: vetrini coprioggetto, liquido di montaggio di altri fornitori); il tampone Biognost® sia stato preparato fresco; confermare che non ci siano problemi di efficienza e funzionamento del microscopio, come lenti degli obiettivi sporche d'olio, cattivo allineamento ottico, lampada esaurita; i vetrini e tutti i componenti Biognost® siano stati conservati correttamente e che nessuno dei componenti usati fosse scaduto; la camera di incubazione fosse sufficientemente umidificata (durante tutti i passaggi dell'analisi non si deve mai permettere l'essiccazione dei pozzetti di reazione), i vetrini siano stati identificati scrivendo con pennarello ad inchiostro indelebile etc. Non forzare mai il processo di riequilibrio di temperatura dei reagenti riscaldandoli.

Ogni legame non specifico da parte del coniugato può essere identificato includendo un bianco tampone in ogni seduta/corsa; es.: dispensare, in un pozzetto di reazione un'aliquota di tampone al posto del campione ed eseguire tutto il processo secondo quanto previsto dalla metodica.

PREPARAZIONE DEL TEST

Se il coniugato è fornito concentrato, prima di iniziare il test, deve essere diluito con il tampone PBS, come indicato in etichetta. Il coniugato, una volta diluito, non è stabile. Va preparato fresco prima di iniziare ogni seduta.

METODICA

Prima di iniziare portare i vetrini Biognost® e tutti i reagenti da utilizzare a temperatura ambiente (circa 5-10 minuti). I controlli ed il coniugato sono formulati per essere pronti all'uso e perciò non richiedono nessuna ulteriore diluizione per l'esecuzione dell'analisi.

Per le istruzioni riguardanti l'uso del Biosorb® come sistema di separazione IgG/IgM (IgG/IgA) e le diluizioni del campione risultanti riferirsi alla sezione COMPONENTI e alle istruzioni per l'uso specifiche Cat.No. S0001tii.

I controlli Biognost®, se necessario, sono già stati pretrattati e perciò non soggetti ad ulteriore trattamento di separazione o di adsorbimento per le varie classi immunoglobuliniche.

Su tutti i vetrini Biognost® l'antigene è già stato fissato. I substrati possono essere distrutti se sottoposti a un secondo processo di fissazione.

Per le appropriate diluizioni di screening e le diluizioni di titolazione raccomandate si prega di consultare le istruzioni specifiche dell'analisi. Prima dell'esecuzione dell'analisi i campioni devono essere diluiti adeguatamente (per screening o titolazione) con tampone fosfato, con o senza 1% di albumina bovina. Prima di incominciare una seduta/corsa, deve essere realizzato un piano di dispensazione ed identificazione per tutti i campioni e controlli che devono essere analizzati. Questo piano è la base per l'interpretazione e la documentazione dei risultati.

1. Aprire la busta alluminata riferendosi alla tacca pre-punzonata e con attenzione estrarre il vetrino. Fare attenzione a non toccare i pozzetti. Se si devono identificare i vetrini, la maniera ottimale è con una matita a mina dura. Non utilizzare pennarelli marker per scrivere sui vetrini.

2. Dispensare un volume sufficiente, di controlli o campioni adeguatamente diluiti, a coprire il pozzetto di reazione (tra 15 e 50 µl, dipende dalla dimensione del pozzetto dei vetrini scelti).

3. Incubare i vetrini in camera umida:

determinazioni di IgG/poli specifiche: 30 minuti a temperatura ambiente

determinazioni di IgM/IgA: 30 minuti a temperatura ambiente

determinazioni di IgM/IgA di patogeni intracellulari (virus, batteri intracellulari): 30 minuti a 37 °C o 60 minuti a temperatura ambiente

Proteggere dalla luce solare diretta; tenere lontani da sorgenti riscaldanti.

4. Rimuovere i vetrini dalla camera umida, scartare l'eccesso di liquido e lavare accuratamente gli stessi con tampone fosfato. (Non spruzzare il tampone direttamente sui pozzetti di reazione!)

5. Immergere i vetrini in PBS e lavare 2 x 5 minuti, usare una vaschetta di decolorazione adeguatamente grande e cambiare il tampone fra i lavaggi. Non agitare quando i vetrini sono immersi nel tampone.

6. Assciugare brevemente i vetrini con gli appositi cartoncini assorbenti. Il substrato non deve seccarsi. Procedere perciò passando immediatamente al punto 7.

7. Dispensare, il coniugato appropriato per ogni analisi, in quantità sufficiente a coprire completamente il pozzetto di reazione (tra 15 e 50 µl, dipende dalla dimensione del pozzetto dei vetrini scelti). Una goccia dispensata dal flacone gocciolatore Biognost® corrisponde a circa 25 µl.

8. Incubare i vetrini per 30 minuti in camera umida. Proteggere dalla luce solare diretta; tenere lontani da sorgenti riscaldanti.

9. Ripetere i passaggi 4-6. Non risciacquare i vetrini con acqua distillata o deionizzata

10. Montare in vetrini coprioggetto mettendo 2-3 gocce di liquido di montaggio per ogni vetrino e, per evitare l'intrappolamento di bolle d'aria, accuratamente abbassare il coprioggetto da un lato all'altro del vetrino. Osservare e valutare i pozzetti di reazione con un microscopio a fluorescenza, per ottenere i migliori risultati questo dovrebbe essere fatto immediatamente. I vetrini possono essere conservati per 24 ore se tenuti al buio e refrigerati evitandone l'essiccamento. Per evitare che il vetrino si attacchi al piano del microscopio o al contenitore di conservazione, rimuovere ogni eccesso di liquido di montaggio con un tovagliolino di carta imbibito con il tampone.

Per le determinazioni EBNA e Gliadina riferirsi ai nostri inserti specifici.

VALUTAZIONE DEI VETRINI E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I vetrini devono essere osservati con un microscopio a fluorescenza a campo scuro con ingrandimento da 400X a 500x (sopravisione con ingrandimento a 100X). Per evitare la perdita di sensibilità, dovuta a foto scolorimento, non rimanere sullo stesso campo di visione più del tempo strettamente necessario alla valutazione. Per risultati ottimali, osservare il maggiore numero di campi possibile in rapida successione.

I risultati di un'analisi possono essere considerati validi solo se gli inclusi controlli danno i risultati attesi.

Per informazioni dettagliate circa la valutazione ed interpretazione delle diverse analisi consultare le istruzioni complete ed usare i parametri riportati nell'inserto tecnico specifico.

Per una corretta valutazione ed interpretazione dei diversi saggi, leggere attentamente le istruzioni specifiche per il saggio in esecuzione.

Si prega di notare che la fluorescenza IgM è meno brillante della IgG, che la fluorescenza dei pattern IgM è differente rispetto ai pattern IgG e che la stessa può variare da campione a campione.

I titoli che vengono riportati in etichetta sui nostri controlli IgM non necessariamente possono essere riprodotti in ogni lotto, ma un controllo positivo non diluito deve sempre dare un risultato positivo.

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

In immunofluorescenza bisogna tenere presente che il titolo può variare di +/- 2 diluizioni. Questa possibilità va valutata attentamente quando si interpreta un risultato.

Quadro fluoroscopico (patterns):

Per valutare i risultati di un'analisi deve essere determinato il quadro fluoroscopico (pattern) della struttura del tessuto o i rispettivi patogeni

Positivo:

La fluorescenza specifica ha il tipico colore verde-mela con intensità variante comunemente classificata su una scala da 1+ (debole), 2+ (moderata), 3+ (forte/brillante) a 4+ molto forte/brillante.

Negativo:

Una fluorescenza classificata inferiore a 1+ è considerata come risultato negativo

Ogni autofluorescenza giallastra o verde scuro è aspecifica e non considerata.

Titolo:

Il titolo è espresso come il reciproco della più alta diluizione che presenti una fluorescenza classificata almeno 1+ . Esempio: se la diluizione 1:80 è valutata 1+ mentre la diluizione 1:160 è valutata negativa, il titolo per questo campione dovrebbe essere riportato come 80.

BIBLIOGRAFIA

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