

Instruções para a utilização do teste ANTICORPO BIOGNOST®

Deteção de ANTICORPOS IgG, IgM e IgA no soro humano por IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA

Tempo total de execução do teste: 90-120 minutos

DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

O Biognost®IFA é um teste por fluorescência indirecta para a determinação qualitativa e/ou semi-quantitativa de anticorpos no soro humano. O teste Biognost® IFA deverá ser utilizado como apoio no diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O teste é baseado no método clássico de imunofluorescência indirecta. As lâminas de substrato foram revestidas com antígeno. Numa primeira fase, uma amostra de soro é colocada na lâmina de teste e incubada. Qualquer anticorpo complementar ao antígeno existente na amostra irá ligar-se ao antígeno-alvo existente na lâmina. As imunoglobulinas que não estabeleceram a ligação e outros componentes da amostra são posteriormente removidos através da lavagem da lâmina com o tampão de lavagem fornecido. Não mover a lâmina durante a lavagem ! Caso contrário o substrato fixo pode sofrer danos ou ser removido. Durante uma segunda fase de incubação, os anticorpos ligados são marcados com imunoglobulina anti-humana conjugada com FITC (o conjugado). O conjugado em excesso é removido lavando as lâminas novamente. O complexo antígeno/anticorpo humano/conjugado formado pode ser visualizado no microscópio de fluorescência numa amplificação de 400 a 500 vezes.

Se é pretendida a deteção específica de anticorpos IgM ou IgA, as amostras são previamente tratadas com um absorvente específico (Biosorb®) que remove as IgG e o factor reumatóide antes da sua colocação na lâmina revestida com o antígeno.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A técnica de imunofluorescência indirecta é utilizada para a deteção de diversos anticorpos em amostras de doentes. Dado que a afinidade dos anticorpos para com o(s) antígeno(s) do teste pode variar significativamente de doente para doente, os resultados do teste são difíceis de padronizar em termos absolutos e anticorpos titulados individuais não reflectem necessariamente a gravidade da doença investigada. Por outro lado, tendo em conta que esta técnica é baseada em lâminas revestidas que contêm a quantidade ideal (teoricamente) de antígenos relevantes, a imunofluorescência indirecta é a mais adequada para a deteção de anticorpos. Quando estão disponíveis controlos positivos titulados com anticorpos identificados, os resultados do teste podem ser avaliados semi-quantitativamente. No entanto, chama-se a atenção dos utilizadores que a avaliação do quadro clínico não deverá ser feita unicamente com base nestes resultados. Os resultados deverão ser sempre interpretados no contexto geral de toda a informação clínica disponível (e.g. sintomas e sinais clínicos, momento da colheita da amostra, outros exames laboratoriais, características específicas dos componentes do teste, valores de referência do próprio laboratório relativos ao teste em causa) e em conjunto com outros dados disponíveis sobre o doente.

MATERIAL E EQUIPAMENTO NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

Recipientes apropriados para preparação de diluições em série das amostras

Pipetas de precisão e pontas para 1-1000 µl

Agitador Vortex

Cilindro de 500 ml ou 1000 ml graduado para preparação do tampão fosfato salino

Água destilada ou desionizada

Câmara incubadora com humedificação

Incubadora (37°C)

Tinas de coloração

Garrafa para o tampão

Relógio

Microscópio de fluorescência de fundo escuro com filtros que permitem a excitação a 450-490 nm e emissão a 560-590 nm (para uma melhor sensibilidade, excitação incidente deve ser preferida à excitação por transmissão). Não utilizar óleo de imersão.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Conservar as lâminas, controlos, conjugados e Biosorb® à temperatura indicada na etiqueta (5-10°C ou ≤ -20°C). Para prevenir a secagem e desnaturação das lâminas revestidas com antígeno, as mesmas deverão ser mantidas dentro da embalagem de alumínio devidamente selada. Controlos, conjugados e lâminas são estáveis até a data de validade indicada na etiqueta, se as recomendações sobre a conservação forem rigorosamente cumpridas. Não utilizar nenhum dos componentes após o seu prazo de validade. O tampão fosfato salino em pó fechado em vácuo, o meio de montagem, o papel absorvente e as tampas podem ser conservadas sem limite de tempo à temperatura ambiente ou inferior. No entanto, todos estes produtos têm prazo de validade que aparece na respectiva etiqueta. A sua função é unicamente facilitar o controlo de stocks. O tampão fosfato salino (pH 7.5) deve ser preparado no próprio dia de utilização, dado que não contém conservantes. No caso de sobrar quantidade suficiente de tampão para ser utilizado no dia seguinte, este deverá ser conservado devidamente fechado e à temperatura de 5-10°C. Não utilizar tampão fosfato salino se o mesmo aparecer turvo, for detectada qualquer coloração ou precipitado ou se o seu pH estiver alterado.

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

1. Todos os soros humanos utilizados no fabrico dos controlos positivo e negativo foram testados e, apesar destes testes terem dado resultados negativos para HBsAg e anticorpos anti-HIV, é aconselhável considerar estes produtos como sendo potencialmente infecciosos e manipulá-los com a devida precaução.
2. Todos os reagentes líquidos, tais como controlos, conjugado etc. contêm 0.09% de azida sódica. Azida sódica é um veneno. Não ingerir e evitar qualquer contacto com a pele e membranas mucosas. Nenhum dos reagentes contendo azida deverá entrar em contacto com objectos que contenham cobre ou chumbo, como por exemplo as canalizações e provocar a formação de azidas metálicas explosivas.
3. O azul de Evans é um possível carcinógeno (veneno de classe 1* de acordo com a classificação suíça de venenos). Não ingerir e evitar qualquer contacto com a pele.
4. Seguir estritamente as precauções de segurança de organizações internacionais e do próprio laboratório (consultar avisos, procedimentos laboratoriais, instruções de segurança etc.).
5. As regras das Boas Práticas Laboratoriais (regras GLP) deverão ser sempre cumpridas.
6. Amostras e reagentes utilizados durante o teste deverão ser deitados fora obedecendo à legislação em vigor.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O teste pode ser efectuado com soro ou plasma. Amostras de soro e plasma são estáveis durante aprox. 1 semana se conservadas à temperatura de 5-10°C. Se é necessário conservar ou testar repetidamente as amostras por períodos mais prolongados, as mesmas deverão ser fraccionadas em pequenas alíquotas (50 µl), congeladas em azoto líquido e conservadas a -20°C. Grandes volumes de soro ou plasma não devem ser submetidos a diversos ciclos de congelação / descongelação dado que esta situação pode provocar agregação de proteínas e degradar alguns dos componentes do soro ou do plasma. Amostras de soro e plasma podem ser estabilizadas com azida a 0.09% desde que isso não provoque interferência no teste. (a azida poderá interferir e.g. com ELISAs baseadas em peroxidase). Tais amostras podem ser conservadas por períodos mais prolongados (até 1 ano) à temperatura 5-10°C sem perda do analito.

No entanto, se as amostras de soro forem testadas para anticorpos IgA ou IgM, deverão ser devidamente pré-tratadas para evitar resultados falsos positivos devido a factores reumatóide em conjunto com anticorpos IgG de forma a prevenir qualquer potencial competição para a ligação ao antígeno por parte das IgG o que poderia

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

provocar resultados falsos negativos. Um sistema de separação pronto a usar da Bios® poderá ser utilizado para esse efeito (Biosorb®). Sendo optimizado especificamente para separação IgG/IgM, este sistema é também adequado para o pré-tratamento de amostras em testes de IgA. Remove IgG em excesso da amostra enquanto tanto as IgM como a maior parte das IgA permanece. Durante este procedimento as amostras serão diluídas. O factor de diluição resultante para as IgM e IgA é de 1:5 e tem que ser tomado em conta na preparação da diluição final da amostra.

CONTROLO DE QUALIDADE E RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Em cada corrida deverão ser colocados controlos positivos para cada parâmetro a ser interpretado e um controlo negativo. Cada controlo deverá provocar a reacção esperada para o teste poder ser validado.

O título obtido para os controlos positivos deve coincidir com o valor do controlo indicado na etiqueta dentro de 1 a 2 passos de diluição. Se não for o caso, deverá verificar o seguinte:

Se há componentes utilizados no teste que não sejam originais fornecidos pela Bios® (e.g. tampas, meio de montagem etc. de outro fornecedor); se o tampão Biognost® utilizado foi preparado fresco; se o microscópio de fluorescência tem alguma deficiência, tal como lente suja com óleo, ajustamento óptico incorrecto, fonte de luminosidade demasiado fraca; se as lâminas Biognost® e os reagentes Biognost® foram conservados correctamente ou estarão fora do prazo de validade; se a câmara de incubação foi suficientemente humidificada (durante o processamento de lâminas nunca se deverá deixar secar os locais de aplicação); se as lâminas foram etiquetadas com marcador etc. Nunca forçar o processo de aquecimento dos reagentes utilizando alguma fonte de calor.

Qualquer ligação não-específica do conjugado pode ser identificada colocando um poço com tampão na corrida; i.e. coloca-se tampão fosfato salino em vez de uma amostra de doente num dos poços da lâmina e processa-se de acordo com o procedimento normal do teste.

RESUMO EXPLICATIVO DO TESTE

Antes de iniciar o teste deixe as lâminas, os controlos e o conjugado Biognost® atingir a temperatura ambiente. Demorará cerca de 5 min. Os controlos e o conjugado estão prontos a usar e, como tal, não necessitam de qualquer diluição antes de serem utilizados.

Para mais informações acerca da utilização do Biosorb® como meio de separação das IgG/IgM (IgG/IgA) e diluição final da amostra, consultar as Instruções de Utilização do produto Cat.No. S0001tip.

Os controlos Biognost® já foram sujeitos a pré-tratamento, quando necessário e, como tal, não deverão ser sujeitos a mais nenhuma separação das imunoglobulinas ou absorções.

O antigénio em todas as lâminas Biognost® já foi fixado. O substrato pode ficar danificado se uma segunda fixação for efectuada.

Consultar as tabelas relativas a cada um dos parâmetros quanto à diluição de detecção e as diluições recomendadas para titulação. Antes do início do teste as amostras de soro deverão ser correctamente (para teste de detecção ou para titulação) diluídas com tampão fosfato salino, com ou sem albumina bovina sérica a 1%.

Antes de iniciar o teste, deve ser estabelecido um plano escrito de distribuição e identificação para todas as amostras e controlos a serem testados. Este registo servirá de base para a interpretação e documentação dos resultados.

1. Rasgar a embalagem de alumínio pelo picotado e retirar cuidadosamente a lâmina Não tocar nas zonas de aplicação. Se pretende etiquetar as lâminas, deverá utilizar um lapis. Nunca utilizar marcadores para escrever nas lâminas

2. Aplicar uma quantidade de controlo suficiente ou diluir correctamente o soro do doente de forma a tapar completamente a zona de aplicação da lâmina (entre 15 e 50 µl, dependendo do tamanho do poço da lâmina seleccionada).

3. Incubar as lâminas numa câmara de incubação humidificada:

Para detecção IgG/poli-específica: 30 min à temperatura ambiente

Para detecção de IgM/IgA: 30 min à temperatura ambiente

Para detecção de IgM/IgA em caso de micróbios intracelulares (vírus, bactérias intracelulares): 30 min a 37°C ou 60 min à temperatura ambiente

Proteger as lâminas de luz solar directa e afastar de fontes de calor.

4. Retirar as lâminas da câmara, secar o excesso de líquidos e enxaguar cuidadosamente com tampão fosfato salino. (Não apontar o jacto do tampão directamente para a zona de aplicação!)

5. Imergir as lâminas 2 x 5 min num banho de tampão fosfato salino; utilizar recipientes suficientemente grandes e trocar de tampão entre os ciclos. Não agitar as lâminas durante a imersão no tampão.

6. Secar rapidamente as lâminas com papel absorvente. Não deixar secar o substrato. Continuar de imediato com o procedimento de acordo com o ponto 7.

7. Aplicar o conjugado correcto em cada uma das zonas de aplicação de forma a que o conjugado cubra totalmente o poço (entre 15 a 50 µl, dependendo do tamanho do poço da lâmina seleccionada). Uma gota do conjugado Biognost® corresponde a aprox. 25 µl.

8. Incubar as lâminas durante 30 min à temperatura ambiente numa câmara de incubação humidificada. Proteger as lâminas de luz e manter afastadas de fontes de calor.

9. Repetir os passos 4 a 6 acima referidos. Não enxaguar as lâminas com água destilada (ou desionizada), senão de imediato.

10. Montar as lamelas colocando 2 ou 3 gotas de meio de montagem em cada lâmina e para evitar formação de bolhas de ar, baixar devagar a lamela de uma ponta a outra da lâmina. Observar de imediato as lâminas num microscópio de fluorescência, para obter melhores resultados. As lâminas poderão ser guardadas até 24 horas num lugar escuro e fresco. Não deixar secar as lâminas. Qualquer excesso de meio de montagem tem que ser limpo com papel embebido em tampão para evitar que as mesmas fiquem coladas à superfície do microscópio ou a base da caixa onde serão guardadas. Consultar tabelas apropriadas para os testes de anticorpos EBNA e anti-gliadina.

AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

As lâminas são visualizadas numa aplicação de 400 a 500 vezes num microscópio por fluorescência de fundo escuro (amplificação 100x). Para evitar perda de sensibilidade por fotobranqueamento, não manter cada uma das zonas da lâmina debaixo do microscópio mais tempo do que o estritamente necessário para a avaliação. Para obtenção de melhores resultados, as diversas áreas deverão ser observadas o mais rapidamente possível uma a seguir a outra.

Uma corrida de testes só pode ser interpretada correctamente, se os controlos nela colocados demonstraram os resultados esperados.

Consultar as instruções de utilização específicas de cada teste e as tabelas específicas de cada parâmetro para mais informações sobre a avaliação e interpretação dos resultados de cada um.

Padrões de fluorescência:

Para avaliar o teste é necessário determinar os padrões de fluorescência das estruturas dos tecidos ou dos respectivos agentes patogénicos.

Positivo:

Fluorescência específica mostra uma cor típica, verde clara e a sua intensidade é normalmente classificada numa escala de 1+ (fraca), 2+ (intermédia), 3+ (brilhante) até 4+ (muito brilhante).

Negativo:

Uma fluorescência classificada de menos de 1+ é considerada como sendo resultado negativo. Qualquer fluorescência amarelada ou verde escura é considerada indeterminada e não deve ser tida em conta.

Título:

Os títulos são definidos como o inverso da diluição mais elevada das amostras que provoca uma fluorescência cuja intensidade é classificada como sendo de pelo menos 1+. Por exemplo, se a diluição 1:80 foi classificada de 1+ enquanto a diluição 1:160 deu resultado negativo, então o título desta amostra será de 80.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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