

Instrukcja używania testu BIOGNOST® PRZECIWCIAŁA



Wykrywanie przeciwciał IgG, IgM oraz IgA w surowicy ludzkiej metodą immunofluorescencji pośredniej

Czas wykonywania testu: 90-120 minut

PRZEZNACZENIE

Biognost® IFA jest pośrednim testem fluorescencyjnym służącym do jakościowego i/lub pół-ilościowego oznaczenia miana przeciwciał w surowicy ludzkiej. Biognost® IFA jest badaniem pomocniczym w diagnostyce *in vitro*.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Test oparty jest o klasyczną metodę immunofluorescencji pośredniej. Szkiełka substratu zostały pokryte antygenem. Badana próbka surowicy pacjenta jest najpierw umieszczana na szkiełku testowym i inkubowana. Wszelkie przeciwciała w próbce będą się wiązać z docelowym antygenem na szkiełku. Niezwiązane immunoglobuliny i inne składniki próbki są następnie usuwane poprzez płukanie szkiełka, za pomocą dostarczonego buforu płuczającego. Nie należy mieszać podczas procedury mycia! W przeciwnym razie unieruchomiony podkład może zostać uszkodzony lub wypłukany. Podczas drugiego etapu - inkubacji, związane przeciwciała są znakowane optycznie za pomocą sprzężonej z FITC anty-immunoglobuliny ludzkiej (konjugat). Nadmiar konjugatu, usuwany jest przez ponowne mycie (płukanie) szkiełek. Tworzone kompleksy antygen/przeciwciało ludzkie/konjugat są widoczne pod mikroskopem fluorescencyjnym, przy powiększeniu od 400 do 500x. Jeśli pożądana jest specyficzna detekcja przeciwciał IgM lub IgA, próbki są najpierw traktowane właściwym absorbentem (Biosorb®), który usuwa IgG oraz czynnik reumatoidalny, przed nałożeniem tych próbek na szkiełko pokryte antygenem.

OGRANICZENIA PROCEDURY

Technika immunofluorescencji pośredniej stosowana jest do wykrywania różnych przeciwciał w badanych próbkach. Ze względu na to, że powinowactwo przeciwciał do badanego antygeny (antygenów) może się w znacznym stopniu zmieniać u poszczególnych pacjentów, wyniki testu są trudne do standaryzacji, w wartościach absolutnych i poszczególne miana przeciwciał niekoniecznie odzwierciedlają intensywność badanej choroby. Z drugiej jednak strony, ze względu na to że technika ta, oparta jest o szkiełka substratu (teoretycznie), bieżący optymalny zakres odpowiednich antygenów, immunofluorescencja pośrednia nadaje się idealnie do badań przesiewowych przeciwciał.

Tam gdzie dostępne są pozytywne próbki kontrolne ze znanym mianem przeciwciał, wyniki testu mogą być oceniane pół-ilościowo. Przypominamy jednak użytkownikom, że ocena obrazu klinicznego nie powinna być opierana wyłącznie na takich wynikach. Wyniki powinny być zawsze interpretowane w ogólnym kontekście związanych informacji (np. objawy kliniczne, termin pobrania próbki, inne spostrzeżenia laboratoryjne, charakterystyczne dla producenta właściwości komponentów testu, wewnętrzny zakres referencyjny dla odpowiedniego testu) w powiązaniu z innymi dostępnymi danymi pacjenta.

ODCZYNNIKI BIOGNOST®

Testy Biognost® są dostępne jako zestawy i indywidualne składniki

Szkiełka substratu: pokryte odpowiednim antygenem.

Kontrola pozytywna: Ustabilizowana surowica ludzka, zawierające przeciwciała dla odpowiedniego antygeny, gotowe do użycia.

Kontrola negatywna: Ustabilizowana surowica ludzka, niezawierająca przeciwciał (IgG, IgM, IgA) oznaczona przez test immunofluorescencyjny, gotowa do użycia.

Koniugat: mono- lub polispecyficzna anty-ludzka immunoglobulina, razem lub bez błękitu Evansa (barwnik), gotowa do użycia.

Bufor PBS: Łatwo rozpuszczalny suchy proszek, do przygotowania 500 ml lub 1000 ml roztworu buforu, pH 7.5, zawierającego 10mM fosforanu sodowego + 150 mM chlorku sodowego.

Osadzona pożywka, matryca do osuszania, szkiełka nakrywkowe i instrukcja użycia.

MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

Odpowiednie pojemniki do przygotowania seryjnego rozcieńczenia próbek

Pipety automatyczne i końcówki do pipet o poj. 1-1000 µl

Mikrowytrząsarka np. typ Vortex

Cylinder miarowy 500 ml lub 1000 ml do przygotowywania roztworu solnego, buforowanego fosforanem

Woda destylowana lub dejonizowana

Nawilżona komora inkubacyjna

Inkubator (37°C)

Pojemniki do barwienia

Butelka na bufor myjący

Stoper z Timerem

Mikroskop fluorescencyjny z ciemnym polem widzenia, z filtrami pozwalającymi na wzbudzenie w zakresie 450-490 nm oraz emisję w zakresie 560-590 nm (dla jak najlepszej czułości powinny być używane pojedyncze wzbudzenia, które mają przewagę w stosunku do wzbudzeń transmisyjnych). Nie używać oleju immersyjnego.

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Wszystkie szkiełka, próbki kontrolne, koniugaty Biosorb® należy przechowywać w temperaturze podanej na etykiecie (5-10°C lub ≤20°C). Aby zapobiec wysychaniu lub denaturacji szkiełek pokrytych antygenem, należy je przechowywać w odpowiednio zamkniętej torebce z laminowanego aluminium. Jeśli ściśle przestrzega się zaleceń, próbki kontrolne, koniugaty i szkiełka są stabilne aż do terminu przydatności podanego na etykiecie. Nie należy używać żadnych przeterminowanych komponentów. Hermetycznie zamknięta, sucha mieszanina soli buforowanej fosforanem oraz pożywka, matryca do osuszania i szkiełka nakrywkowe mogą być przechowywane, bez ograniczeń w temperaturze pokojowej lub niższej. Termin przydatności tych produktów znajduje się na etykiecie i służy tylko celowi łatwej kontroli magazynowej. Bufor myjący PBS (pH 7.5), powinien być świeżo przygotowany w dniu jego użycia, ponieważ nie zawiera środków konserwujących. Niewykorzystany roztwór buforowy, można użyć następnego dnia, jeśli był przechowywany pod odpowiednim przykryciem w temperaturze 5-10°C. W razie pojawienia się zmętnienia zabarwienia, kłaczkowatego osadu lub w przypadku zmiany pH bufor PBS należy usunąć.

ŚRODKI BEZPIECZEŃSTWA

1. Wszelkie surowice ludzkie użyte do produkcji próbek pozytywnych i negatywnych zostały zbadane w kierunku HBsAg oraz na przeciwciała HIV (są negatywne). Pomimo to odczynniki te muszą być uważane za potencjalnie zakaźne i należy się z nimi obchodzić z należytą ostrożnością.
2. Wszystkie odczynniki płynne, takie jak próbki kontrolne, koniugat itp. zawierają 0.09% azydek sodu, który jest trujący. Należy unikać kontaktu ze skórą oraz błonami śluzowymi i nie połykać. Nie można dopuścić do kontaktu odczynników zawierających azydki z przedmiotami zawierającymi miedź lub ołów, np. określonych rur odpływowych, ponieważ może to doprowadzić do tworzenia się wybuchowych azydków metali.
3. Błękit Evansa jest możliwym karcinogenem (klasa 1 trucizn, zgodnie z Szwajcarską listą trucizn). Użytkownicy powinni uważać, aby roztwory zawierające błękit Evansa nie zostały połknięte, należy unikać wszelkiego ich kontaktu ze skórą.
4. Należy ściśle przestrzegać przepisów bezpieczeństwa stowarzyszeń zawodowych oraz odpowiednich instytutów (laboratoriów) - (patrz uwagi, wytyczne dla laboratorium, instrukcje bezpieczeństwa itp.).
5. Wytyczne Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP), powinny być zawsze przestrzegane.
6. Materiały i odczynniki użyte w testach muszą być usuwane zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa.

MATERIAŁ DO TESTÓW

Do testów nadaje się zarówno surowica jak i osocze. Próbki surowicy i osocza są stabilne przez okres ok. 1 tygodnia, jeśli przechowywane są w temperaturze 5-10°C. Jeśli potrzebny jest dłuższy okres przechowywania lub powtarzanie testów na próbkach przez dłuższe okresy, próbki powinny być dzielone na małe porcje (50 µl), szybko zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -20°C lub niższej. Większe objętości surowicy lub plazmy nie powinny być poddawane cyklom

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

zamrażania-rozmrażania, ponieważ może to powodować agregację białek i degradację niektórych składników surowicy i plazmy. Próbkę surowicy i plazmy mogą być również stabilizowane za pomocą 0.09% azydki sodu, jeśli nie będzie to kolidowało z testem (azydek kolidowałby np. z testem ELISA opartym o peroksydazę). Próbki takie mogą być przechowywane przez dłuższe okresy czasu (do 1 roku) w temperaturze 5-10°C bez utraty właściwości analitycznych.

Jeśli jednak próbki surowicy mają być testowane pod kątem przeciwciał IgA lub IgM, powinny być poddane odpowiedniej obróbce w celu uniknięcia fałszywych reakcji pozytywnych, z powodu czynników reumatoidalnych w powiązaniu z przeciwciałami IgG oraz w celu zapobieżenia potencjalnej konkurencji dla miejsc wiązania antygeny z IgG, co może prowadzić do fałszywych wyników negatywnych. Do tego celu może być wykorzystany gotowy do użycia system separujący (Biosorb®) firmy Bios®. Chociaż system ten jest optymalizowany dla separacji IgG/IgM, nadaje się również do obróbki wstępnej próbek w testach IgA. Usuwa on z próbki nadmiar IgG, podczas gdy zarówno IgM jak i większość IgA pozostaje. Podczas omawianej procedury próbki zostaną rozcieńczone. Współczynnik rozcieńczenia dla IgM oraz IgA wynosi 1:5 i musi być brany pod uwagę podczas przygotowania ostatecznych roztworów próbek do testów.

KONTROLA JAKOŚCI ORAZ USUWANIE PROBLEMÓW

Dla każdego interpretowanego parametru, do każdej partii badań, powinna być dołączana kontrolna próbka pozytywna i negatywna. W celu walidacji testu, każda próbka kontrolna musi wykazywać oczekiwane reakcje.

Miano uzyskane dla pozytywnej próbki kontrolnej, powinno być zgodne z wartością kontrolną podaną na etykiecie z dokładnością do ± 1 do 2 stopni rozcieńczenia. Jeśli tak nie jest, należy sprawdzić:

Czy użyte do testu komponenty były oryginalnie dostarczone przez Bios® (np. szkiełka nakrywkowe, pożywka itp. czy od innego dostawcy); czy bufor Biognost® był świeżo przygotowany; czy są jakiegokolwiek braki funkcjonalne dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego, takie jak smugi oleju na obiektywie, zła regulacja optyczna, słabe źródło światła; czy szkiełka Biognost® i odczynniki Biognost® były prawidłowo przechowywane, czy były zastosowane komponenty przeterminowane; czy komora inkubacyjna była odpowiednio nawilżona (podczas obróbki szkiełek miejsca nałożenia nie mogą wyschnąć na żadnym etapie), czy szkiełka były oznakowane markerem z miękką końcówką itp. Nigdy nie przyspieszać procesu podgrzewania odczynników przez dostarczanie ciepła. Wszelkie niespecyficzne powiązania koniugatu, mogą być zlokalizowane przez dołączenie czystego bufora do badanej partii; tj. do jednej z komórek na szkiełku zamiast badanej próbki od pacjenta podawany jest bufor PBS i poddawany normalnej procedurze testowej.

PROCEDURA TESTU

Przed rozpoczęciem testu należy doprowadzić szkiełka Biognost®, próbki kontrolne, koniugaty do temperatury pokojowej. Trwa to około 5 min. Próbki kontrolne i koniugaty są gotowe do użycia (bez potrzeby ich rozcieńczenia).

Wskazówki dotyczące stosowania środka Biosorb® jako systemu do separacji IgG/IgM (IgG/IgA) i zapewnienia ostatecznego rozcieńczenia próbek - patrz instrukcja użycia nr kat. S0001tipl.

Próbki kontrolne Biognost® zostały już w miarę potrzeby poddane obróbce wstępnej i dlatego nie powinny być poddawane dalszej separacji lub absorpcji immunoglobuliny.

Antygen na wszystkich szkiełkach Biognost® został utrwalony. Powtórne przeprowadzenie utrwalania może zniszczyć substraty.

Sprawdzić w karcie parametrów odpowiednie rozcieńczenie dla badania przesiewowego oraz rozcieńczenie zalecane do określania miana. Przed przeprowadzeniem testów, próbki surowicy muszą być odpowiednio (testy przesiewowe lub do określania miana) rozpuszczone w buforze PBS, albo z 1% albuminą surowicy wołowej lub bez niej.

Przed rozpoczęciem testu należy starannie określić rozkład i plan identyfikacji wszystkich próbek badanych i kontrolnych. Formularz jest podstawą do interpretacji i dokumentacji wyników.

1. Rozerwać laminowaną folię aluminiową na perforowanym nacięciu i ostrożnie wyjąć szkiełko. Zwrócić uwagę, aby nie dotykać żadnych miejsc nanoszenia. Jeśli szkiełka mają być znakowane, najlepiej zrobić to ołówkiem. Do pisania na szkiełkach nie używać nigdy markerów z miękką końcówką.
2. Nałożyć odpowiednią ilość odczynnika kontrolnego lub odpowiednio rozcieńczonej surowicy pacjenta tak, aby całkowicie pokryć miejsce nanoszenia (od 15 do 50 μ l, zależnie od wielkości wgłębienia wybranych szkiełek).
3. Inkubować szkiełka w nawilżonej komorze inkubacyjnej.
Detekcja IgG/polispecyficzna: 30 min. w temperaturze pokojowej
Detekcja IgM/IgA: 30 min. w temperaturze pokojowej
Detekcja IgM/IgA w przypadkach drobnoustrojów wewnątrzkomórkowych (wirusy, bakterie wewnątrzkomórkowe np. Bartonella, Chlamydia, Ehrlichia) 30 min. w temperaturze 37°C lub 60 min. w temperaturze pokojowej
- Chronić szkiełka przed bezpośrednim światłem słonecznym; trzymać z daleka od grzejników.
4. Wyjąć szkiełka z komory, zlać nadmiar płynu i ostrożnie wypłukać szkiełka buforem płuczącym. (Nie kierować strumienia bufora bezpośrednio na miejsca nałożenia!)
5. Zanurzyć szkiełka na 2 x 5 min w kąpeli z buforu; używać dużych pojemników do barwienia i wymieniać bufor pomiędzy cyklami. Nie poruszać szkiełkami w kąpeli buforowej.
6. Za pomocą matrycy do osuszania osuszyć szkiełka. Na tym etapie, nie można pozwolić na wyschnięcie substratu. Dlatego należy natychmiast przejść do punktu 7.
7. Nałożyć odpowiednią ilość koniugatu na każde miejsce nanoszenia tak, aby koniugat całkowicie pokrył zagłębienie (od 15 do 50 μ l, zależnie od wielkości zagłębienia wybranych szkiełek). Jedna kropla koniugatu firmy Biognost® dozowana z fiolek, odpowiada około 25 μ l.
8. Inkubować szkiełka 30 min. w temperaturze pokojowej w nawilżonej komorze inkubacyjnej. Chronić szkiełka przed światłem; trzymać z daleka od grzejników.
9. Powtórzyć punkty 4 - 6 jw. W celu poprawienia kontrastu, przy stosowaniu koniugatów bez błękitu Evansa, końcowe płukanie szkiełka można wykonać buforem płuczającym zawierającym błękit Evansa. Przygotowuje się go dodając 1-2 krople roztworu błękitu Evansa (Nr kat. 1613) do 100 ml buforu myjącego. Nie płukać szkiełek wodą destylowaną (lub dejonizowaną), ale niezwłocznie:
10. Nałożyć szkiełka nakrywkowe umieszczając 2 lub 3 krople pożywki na każde szkiełko i unikając uwiecznienia pęcherzyków powietrza, ostrożnie opuścić szkiełko nakrywkowe z jednego do drugiego końca. Dokonać oceny szkiełek za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Najlepsze wyniki uzyskuje się wykonując to natychmiast. Szkiełka mogą być przechowywane do 24 godzin w ciemnym i chłodnym miejscu i powinny być chronione przed wysychaniem. Wypływający nadmiar pożywki powinien być wytarty papierowym ręcznikiem zwilżonym buforem, aby zapobiec przyklejaniu się szkiełek do stolika mikroskopu lub do podstawy w pojemnika do przechowywania szkiełek. W naszych specjalnych kartach katalogowych znaleźć można informacje, na temat odczynników EBNA oraz testów na przeciwciała Gliadyny.

OCENA SZKIEŁEK I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Szkiełka są oglądane przy powiększeniu 400 do 500x pod mikroskopem fluorescencyjnym w ciemnym polu widzenia (widok ogólny przy powiększeniu 100x). Aby uniknąć straty czułości w wyniku fotowysbielania, nie należy pozostawiać w tym samym polu widzenia dłużej niż jest to rzeczywiście niezbędne do oceny. W celu uzyskania najlepszych wyników powinno się w szybkiej sekwencji oglądać tak wiele pól, jak to jest praktycznie możliwe.

Badana partia może być interpretowana tylko wówczas, gdy próbki kontrolne włączone do wsadu dają oczekiwane wyniki.

Szczegółowe informacje na temat oceny i interpretacji poszczególnych testów, można znaleźć w pełnych instrukcjach użycia oraz kartach katalogowych dla określonych parametrów.

Charakterystyka (rozkład) fluorescencji:

W celu oceny testu określone muszą zostać charakterystyki fluorescencji struktur tkankowych lub odpowiednich patogenów.

Pozytywna:

Specyficzna fluorescencja wykazuje charakterystyczny jasnozielony kolor. Intensywność zabarwienia jest zwykle klasyfikowana w skali od 1+ (słaby), poprzez 2+ (średni), 3+ (jasny) do 4+ (bardzo jasny).

Negatywna:

Ocena fluorescencji poniżej 1+ oznacza wynik negatywny. Fluorescencja żółtawa lub ciemnozielona jest niespecyficzna i nie może być brana pod uwagę.

Miano przeciwciał:

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

Miana są podawane jako odwrotność najwyższego rozcieńczenia próbki, które daje intensywność fluorescencji ocenioną, na co najmniej 1+. Jeśli na przykład rozcieńczenie 1:80 było ocenione na, 1+ podczas gdy rozcieńczenie 1:160 dało wynik negatywny, wówczas miano tej próbki byłoby podane jako 80.

LITERATURA

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