

**Használati utasítás a BIOGNOST® ANTITEST Assay-hez**

Humán szérum IgG, IgM és IgA ANTITEST-jeinek meghatározása INDIREKT IMMUNOFLUORESCENCIÁ-san.

A meghatározás időtartama: 90-120 perc.

**FELHASZNÁLÁSI TERÜLET**

A Biognost® IFA egy indirekt fluoreszcens antitest assay a humán szérum antitestjeinek kvalitatív és/vagy szemi-quantitatív meghatározására. A Biognost® IFA in vitro diagnosztikai módszer.

**A MEGHATÁROZÁS ELVE**

A teszt alapja egy klasszikus indirekt immunfluoreszcenciás eljárás. A szubsztrát lemezek antigénnel vannak bevonva. Először a beteg mintákat kell a teszt lemezekre heklvezni és inkubálni. A mintában jelenlévő antitestek kötődni fognak a target antigénekhez a lemezen. A nem kötődött immunglobulinok és a minta egyéb komponensei ezt követően eltávolítandók a lemez mosó pufferben történő öblítésével. Kerülni kell a mosási eljárás alatt a lemezek mozgását! Mássalkülben az immobilizált antigének károsodhatnak, vagy kimosódhatnak. A második inkubálási lépés alatt a kötődött antitestek inkubálása FITC-el jelölt anti-humán immunglobulinnal (konjugátum) történik. A konjugátum feleslege a lemezek újbóli mosásával távolíthatók el. Az antigén/humán antitest/konjugátum komplexek fluoreszcens mikroszkóp 400-500-szoros felbontásával vizsgálhatók.

Ha az IgM vagy IgA antitestek specifikus detektálása a követelmény, a mintákat először specifikus abszorbenssel (Biosorb®) kezelje, így távolítsa el az IgG-t és rheumatoid faktort, mielőtt ezeket a mintákat az antigénnel bevont lemeze helyezni.

**AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI**

Az indirekt immunfluoreszcens technika a beteg mintákból különböző antitestek detektálására használható. Mivel a teszt antigénekhez az antitestek affinitása nagymértékben változik az egyes betegek között, a teszt eredményeit nehéz standardizálni az abszolút feltételekben és az egyéni antitest titer nem feltétlenül tükrözik a vizsgált betegség intenzitását. Másrészt, ez a technika szubsztrát lemezeken alapszik, melyen a releváns antigének (elméletileg) optimális mennyisége van jelen, az indirekt immunfluoreszcencia ideálisan alkalmas antitest kimutatásra.

Ahol a pozitív kontrollok ismertek az antitest titeri, a teszt eredményei szemikvantitatívan értékelhetők. Fel kell hívni a felhasználók figyelmét, hogy a klinikai kép felállításánál nem csak ezt az egy eredményt kell figyelembe venni. Az eredmények interpretációja valamennyi rendelkezésre álló információ figyelembe vételével történjen (pl. klinikai szimptomák és jelek, megfelelő mintavétel, más laboratóriumi leletek, gyártó specifikus jellemzése az assay komponenseihez, az adott laboratóriumban a respektív teszttel meghatározott referencia range) és a rendelkezésre álló beteg adatokkal együtt.

**BIOGNOST® REAGENSEK**

Biognost® assay-k beszerezhetők kit vagy egyéni komponensek formájában:

Szubsztrát lemez: respektív antigénnel bevont.

Pozitív kontroll: stabil humán szérum, respektív antigénekhez kötődő antitesteket tartalmaz, felhasználásra kész.

Negatív kontroll: stabil humán szérum, immunfluoreszcens assay-val meghatározott antitestekre (IgG, IgM, IgA) nézve negatív, felhasználásra kész.

Konjugátum: mono- vagy polispecifikus anti-humán immunglobulin, Evans kék fedőfestékkel, vagy a nélkül, felhasználásra kész.

PBS puffer: könnyen oldódó por keverék; készíthető 500 ml vagy 1000 ml puffer oldat, pH 7.5, 10 mM nátrium-foszfátot + 150 mM nátrium-kloridot tartalmaz.

Mounting medium, itatóspapír, fedőlemezek, használati utasítás.

**SZÜKSÉGES ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK**

Megfelelő tartók a mintákból készített hígítási sorozathoz

1-1000 µl-es precíziós pipetták és pipetta hegyek

Vortex

500 ml vagy 1000 ml-es lombik a foszfát puffer oldat készítéséhez

Desztillált vagy deionizált víz

Nedves inkubációs kamra

Inkubátor (37°C)

Festő-kádad

Mosó üveg a puffernek

Óra

Sötétlátóteres mikroszkóp 450-490 nm gerjesztett filterrel és 560-590 nm emisszióval (a jobb szenzitivitás érdekében a visszaverődő gerjesztést előnyben részesítik a transzmissziós gerjesztéssel szemben). Ne használjon immerziós olajt!

**TÁROLÁS ÉS STABILITÁS**

Valamennyi lemezt, kontrollt, konjugátumot és Biosorb® at-t a címkén megadott hőmérsékleten tárolja (5-10°C vagy -20°C-on, vagy az alatt). Meg kell akadályozni az antigénnel bevont lemezek kiszáradását és denaturálását, ezért megfelelően lezárt alumínium tasakokban kell tartani. Az ajánlott tárolási követelések szigorú követése mellett a kontrollok, konjugátumok és lemezek a címkén jelzett lejárati ideig stabilak. A lejáratot követően a komponenseket ne használja!

A légmentesen zárt foszfát-só puffer por keveréket, valamint a mounting medium-t, itatóspapírt és a fedőlemezeket határozatlan ideig tárolhatja szobahőn vagy az alatt. Ezen tételek termék címkéjén ennek ellenére lejárati dátum van feltüntetve. Ez csak megszokás, semmilyen célt nem szolgál.

A PBS mosó puffer (pH 7.5) a használat napján frissen készíthető, tartósítószeret nem tartalmaz. Amennyiben a maradék puffer oldatot megfelelően, 5-10°C-on tárolja, a későbbiekben is felhasználhatja. Öntse ki a PBS puffert, ha zavarossá válik, elszíneződik, precipitátumok jelennek meg benne, vagy a pH-ja megváltozik.

**BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK**

1. Valamennyi humán szérum, amelyet a pozitív és negatív kontrollok készítéséhez használtak, HBsAg és HIV antitestekre nézve be lettek vizsgálva és negatív eredményeket adtak.

Mindemellett ezeket a reagenset a potenciális infekciók figyelembe vételével megfelelő elővigyázatossággal kell kezelni.

2. Valamennyi folyékony reagens, úgymint a kontrollok, konjugátum, stb. 0.1% nátrium-azidot tartalmaz. A nátrium-azid mérgező. Ne nyelje le és kerülje a bőrrel és a mucos membránnal való érintkezését. Az azid tartalmú reagens ne kerüljenek kapcsolatba réz vagy ólom tartalmú tárgyakkal, mert ez robbanó fém-azidok keletkezéséhez vezethet.

3. Az Evans-kék karcinogén (a Swiss méreg-táblázat alapján 1. osztályú méreg). A felhasználónak tanácsolt, hogy ne nyelje le és kerülje a bőrrel való érintkezését az Evans-kéket tartalmazó oldattal.

4. A hivatalos biztonsági előírásokat, valamint az egyéni irányelveket szigorúan követni kell (lásd: laboratóriumi irányelvek, biztonsági instrukciók, stb.).

5. Az aktuális Good Laboratory Practice (GLP irányelvek) szabályait mindig követni kell.

6. Az anyagokat és reagenset rendeltetészerűen szabad használni az alkalmazott jogi szabályoknak megfelelően.

**A TESZTHEZ HASZNÁLT ANYAGOK**

A meghatározáshoz szérum és plazma egyaránt használható. A szérum és plazma minták stabilitásukat 5-10°C között körülbelül 1 hétig őrzik meg. Amennyiben a minták hosszabb időn keresztül tárolást vagy újrafelhasználást igényelnek, a mintákat ossza kisebb adagokra (50 µl), hirtelen fagyassza folyékony nitrogénnel, majd –

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

20°C-on tárolja. A szérumot vagy plazmát ne tegye ki ismételt fagyasztásnak-olvasásnak, mert az a fehérje aggregátumok képződését és a szérum és plazma néhány komponensének degradációját okozhatja. A szérum és plazma minták stabilitását 0.1% azid-dal biztosíthatja (1 rész 1%-os törzsoldat és 9 rész szérum vagy plazma), ez nem gátolja a meghatározást (az azid gátolja például a peroxidáz alapú ELISA-kat). Így a minták hosszabb ideig megőrizhetik stabilitásukat (akár 1 év) 5-10°C-on analízis veszteség nélkül.

Ha a szérum mintákból IgA vagy IgM antitesteket határoz meg, először megfelelő előkezeléssel távolítsa el a fals pozitív eredményeket adható rheumatoid faktorokat az IgG antitestekkel együtt és akadályozza meg az IgG antitestek antigén kötőhelyekért történő versengését, melyek fals negatív eredményekhez vezethetnek. E célból felhasználásra kész szeparációs rendszer beszerezhető a Bios®-tól (Biosorb®). Bár elsősorban az IgG/IgM elválasztásra optimalizált, a rendszer alkalmas a minták IgA méréséhez történő előkezelésére is. A felesleges IgG – eltávolítva, a mintában csak az IgM és IgA marad. A procedúra alatt a minták hígítottá válnak. Az IgM és IgA eredő hígítási faktora 1:5, amit figyelembe kell venni a teszt végső mintahígításánál.

### MINŐSÉGELLENŐRZÉS ÉS HIBAELHÁRÍTÁS

A pozitív és negatív kontrollt mindegyik indításnak tartalmaznia kell. Mindegyik kontrollnak a várt eredményeket kell mutatnia a teszt értékelhetőségéhez.

A pozitív kontrollokra kapott titereknek meg kell felelniük a címkén feltüntetett kontroll értékeknek. Ha ez nem történik meg, akkor ellenőrizze a következőket:

A tesztben használt komponensek nem a Bios-tól származnak (pl. fedőlemezek, mounting medium stb. más szállítótól valók); a puffer frissen készített-e; van-e valamilyen funkcionális rendellenessége a fluoreszcens mikroszkópnak, úgymint az objektív lencse olajjal való bekenése, gyenge optikai beállítás, gyenge szórt fény; a lemezeket és reagenseket helyesen lettek-e tárolva vagy a felhasznált komponensek már lejártak; az inkubációs kamra elegendően nedves volt-e (a feldolgozás alatt a lemezek applikációs helyeit nem szabad kiszáradni hagyni), a lemezek filctollal meg lettek-e jelölve, stb. Tilos a reagensek megfelelő hőmérsékletének elérését meglejtéssel felgyorsítani.

A konjugátum nem specifikus kötéseit a teszt során indított puffer vakkal lehet megállapítani; ú.m. a beteg minta helyett foszfát-só puffer oldatot helyezzen a lemez egyik lyukára és a szokásos eljárásnak megfelelően dolgozza fel.

### A MEGHATÁROZÁS MENETE

A meghatározás kezdete előtt a Biognost® lemezeket, kontrollokat, konjugátumokat szobahőmérsékletűre kell hozni. Ez kb. 5 perc. A kontrollok és a konjugátumok felhasználásra készek és így további hígításuk nem szükséges.

A 00110042-366105-901048-901120tie katalógus számú használati utasítás tartalmazza a Biosorb® IgG/IgM (IgG/IgA) szeparációs rendszer és a minta végső hígítására vonatkozó előírásokat.

A Biognost® kontrollok már előkezeltek, így egyéb immunglobulin osztályok szeparálására vagy abszorpciójára nem alkalmasak.

Valamennyi Biognost® lemez antigénnel fixált. A második fixációs lépés által a szubsztrátok eltávolíthatók.

Nézzon utána a megfelelő screening hígításnak és a titrálásához ajánlott hígításoknak a paraméter specifikus adatlapon.

A teszt előtt a szérum mintákat megfelelően hígítani kell (screening teszt vagy titrálás) foszfát-só pufferrel, akár 1% marhaszérum albuminnal, vagy a nélkül.

Az assay kezdete előtt egy elrendezési és meghatározási tervet kell készíteni valamennyi mintára és kontrolllra a megfelelő formában.

Ez a forma az alapja az eredmények interpretációjának és dokumentálhatóságának.

1. A perforációnál szakítsa ki a lezárt alumínium tasakot és vegye ki a lemezt. Vigyázzon, hogy a felviteli helyekhez ne érjen hozzá. Ha a lemezeket jelölni kell, azt legjobb ceruzával tenni. Tilos filctollal használni a lemezek megírásához.

2. Helyezzen megfelelő mennyiségű kontrollt vagy megfelelően hígított beteg szérumot mindegyik felviteli helyre, úgy, hogy az oldat teljesen fedje a lyukakat (15 és 50 µl között, a választott lemezek lyuk méretétől függően).

3. Inkubálja a lemezeket nedves kamrában:

IgG/polispecifikus meghatározás: 30 perc szobahőn.

IgM/IgA meghatározás: 30 perc szobahőn.

IgM/IgA meghatározás intracelluláris mikrobák (vírusok és intracelluláris baktériumok, pl. Bartonella, Chlamydia, Ehrlichia): 30 perc 37°C-on vagy 60 perc szobahőn.

Védje a lemezeket a direkt napsütéstől; tartsa távol a fűtőtestektől.

4. Vegye ki a lemezeket a kamrából, a folyadék feleslegét távolítsa el és óvatosan öblítse le a lemezeket foszfát-só pufferrel. (A cél nem a puffer közvetlen applikációs helyekre történő öntése!)

5. Merítse a lemezeket 2x 5 percre foszfát-só pufferbe; használjon nagy festő kádakat és cserélje a puffert a ciklusok között. Ne mozgassa a lemezeket a két mosás alatt.

6. Törölje szárazra a lemezeket itatóspapírral. Ebben a szakaszban a szubsztrátot nem szabad kiszáradni hagyni. Ezért folytassa a 7. lépéssel.

7. Helyezze a megfelelő konjugátumot mindegyik felviteli helyre, úgyhogy a konjugátum teljesen fedje a lyukakat (15 és 50 µl között, a választott lemezek lyuk méretétől függően). Egy csepp a Biognost® konjugátumból 25 µl-nek felel meg.

8. Inkubálja a lemezeket 30 percig szobahőn, nedves kamrában. Védje a lemezeket a direkt napsütéstől; tartsa távol a fűtőtestektől.

9. Ismétlje meg a 4-6 lépést. Ne öblítse a lemezeket desztillált (vagy deionizált) vízzel, azonban közvetlenül:

10. Helyezzen mindegyik lemezre 2-3 csepp mounting medium-ot, a légbuborékok eltávolításával légmentesen fedje le a lemezeket fedőlemezzel. Értékelje a lemezeket fluoreszcens mikroszkóppal. A legjobb eredményeket akkor éri el, ha a lemezek értékelését azonnal elvégzi. A lemezek 24 órán át tárolhatók sötétben és hűvös helyen és védeni kell őket a kiszáradástól. A túlfolyó mounting medium-t törölje le pufferrel benedvesített papírtörölvél, a lemezeknek a mikroszkóp tárgylapjához vagy a tároló doboz aljához történő ragadásának megakadályozása miatt.

Az EBNA és a gliadin antitest meghatározásra utalást talál a specifikus adatlapon.

### A LEMEZEK ÉRTÉKELÉSE ÉS AZ EREDMÉNYEK INTERPRETÁCIÓJA

A lemezeket sötétlátóteres fluoreszcens mikroszkóp alatt 400-500-szoros felbontással nézze (általában 100szoros nagyítás). Ahhoz, hogy elkerülje a lemezek szenzitivitásának elvesztését, ne időzzön egy látóteren hosszabb ideig, mint amit az értékelés feltétlenül megkíván. A legjobb eredmények elérése érdekében vizsgáljon át gyorsan több látóteret is.

A tesztek csak akkor interpretálhatók, ha a tesztben indított kontrollok a várt eredményeket mutatják.

Nézzon utána az assay értékeléséhez és interpretációjához szükséges részletes információknak a paraméter specifikus adatlapon.

#### Fluoreszcens mintázatok:

A meghatározás értékeléséhez a kötőszöveti struktúrák vagy a respektív patogének fluoreszcens mintázatát kell meghatározni.

#### Pozitív:

Tipikus, világos almazöld színű fluoreszcenciát mutat és az intenzitás foka általában 1+ (gyenge)-től, a 2+ (közepes), 3+ (erős) át 4+ (nagyon erős)-ig terjed.

#### Negatív:

Ha a fluoreszcens ráta kisebb, mint 1+, a minta negatívnak tekintendő. A sárga vagy sötét szürke fluoreszcencia aspecifikus és nem kell figyelembe venni.

#### Titer:

A titerérték megadásánál azt a legnagyobb hígítást vegye figyelembe, ahol a fluoreszcens intenzitás foka legalább 1+. Például, ha az 1:80 hígítás foka 1+, miközben az 1:160 hígítás negatív eredményt ad, akkor a minta titerét 1:80- nak adja meg.

### IRODALMAK

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