

Instrucciones de empleo BIOGNOST® test ANTÍGENO

DFA: Detección de ANTIGENOS por INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA: Técnica de un solo paso basada en anticuerpos mono o policlonales marcados con FITC

IFA: Detección de ANTIGENOS por INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA: Técnica en dos pasos basada en anticuerpos primarios mono o policlonales y marcados con anticuerpos secundarios FITC.

PRINCIPIOS DEL TEST

El test se basa en el método clásico de la inmunofluorescencia.

En primer lugar, las muestras de los pacientes se disponen sobre un porta adecuado para el procedimiento de fijación (ver punto Colección y Preparación de las muestras). A continuación se cubren con un reactivo de anticuerpos correspondiente a antígenos específicos apropiados, bien con un anticuerpo conjugado fluorescente (DFA) o un anticuerpo primario / antisuero no marcado (IFA) y se incuban. Si la muestra es positiva, los anticuerpos mono o policlonales se fijarán a los antígenos específicos. El exceso de anticuerpos se elimina mediante el lavado con el tampón suministrado.

1. DFA: se monta un cubre-porta

2. IFA: por medio de una segunda incubación, cualquier anticuerpo primario se fija al anticuerpo secundario (conjugado) marcado con FITC. El exceso de conjugado se elimina mediante un nuevo lavado con el tampón suministrado.

Los complejos formados antígeno / conjugado (DFA) o antígeno / anticuerpo primario / conjugado (IFA) pueden visualizarse bajo un microscopio de fluorescencia de 400- 500 aumentos. La sensibilidad y especificidad de conjugado / anticuerpo primario pueden comprobarse con los portas correspondientes de antisuero / conjugado. No agitar el porta durante el proceso de lavado ya que se puede dañar o eliminar el antígeno inmovilizado.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los tests de antígeno por inmunofluorescencia Biognost® permiten la determinación cualitativa del patógeno causante de la enfermedad, bien por la muestra directamente o por aislamiento microbial. Un resultado positivo determina el diagnóstico de la infección del patógeno en consideración, siempre que no se hayan analizado más de una muestra por porta. Se deben reexaminar los tests positivos, si se han obtenido más de un resultado positivo con diferentes muestras clínicas en un mismo porta (o en portas diferentes que se hayan introducido en el mismo baño de tinción). Pueden producirse reacciones cruzadas entre diferentes muestras con diferentes aplicaciones durante el proceso de lavado. En estos casos, todos los resultados deben ser confirmados individualmente (aplicando una sola muestra de paciente por porta y baño de tinción).

No obstante, al igual que con otros métodos de detección de antígeno, un resultado negativo no puede excluir totalmente una infección por este patógeno en cuestión. Siempre puede haber la posibilidad de que el germen infeccioso no esté presente en esa muestra en particular. Por lo tanto, si se sospecha de una infección aun con resultado negativo del test, deberá realizarse otro test con una muestra reciente, o bien confirmar el resultado con una análisis serológico o por cultivo.

REACTIVOS BIOGNOST® DISPONIBLES

DFA: conjugado específico al patógeno (poli o monoclonal, listo para el empleo o concentrado), portas de control, PBS, medio de montaje, cubre-portas.

IFA: anticuerpo específico al patógeno (poli o monoclonal, listo para el empleo o concentrado), anticuerpo secundario marcado FITC, portas de control, medio de montaje, cubre-portas.; Ver lista de precios BIOS.

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

Microscopio 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 5 y 10 °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 kits y reactivos deben tratarse como potencialmente infecciosos y tratarse con el adecuado cuidado p. Ej. Llevar guantes desechables, mascara y protección de los ojos (ver regulaciones de seguridad de su laboratorio).
2. Todos los kits y reactivos Biognost® para la detección de antígenos son solo para el diagnóstico in vitro.
3. Las soluciones de anticuerpos (anticuerpos primarios y conjugados) así como el medio de montaje contienen 0,09% azida de sodio u otro conservante. Todos los conservantes son tóxicos. 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 ácidos metálicos explosivos
4. 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.
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 la recolección, estabilización, transporte y preparación de las muestras contribuyen considerablemente en los resultados del test. Previamente a la realización del test para la determinación de antígeno Biognost® los laboratorios deberán establecer un procedimiento de colección y tratamiento de antígeno (junto con clínicos y patólogos).

En caso de infecciones gastrointestinales el antígeno se halla más fácilmente en las heces. Las muestras deben conservarse con formalina al 10%. (No es adecuada la

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

conservación con alcohol de polivinilo o yodo-timerosal-formaldehído).

En caso infecciones de las vías respiratorias, el antígeno específico puede obtenerse por: lavado bronco-alveolar, biopsia broncoscópica, aspiración transtraqueal, esputo inducido, raspado de garganta o naso-faríngeo, punción pleural, autopsia y cultivo (test confirmación cultivo).

Las muestras de esputo deben ser pretratadas con ditiotreitól o N-acetilcisteína para reducir la viscosidad.

HSV es fácilmente detectable en el fluido o raspado vesicular.

Una detección fiable solo es posible, si las muestras colectadas contienen un número suficiente de células infectadas. Para conservar la infectividad en aquellos casos que deban realizarse análisis en paralelo o de confirmación por medio de cultivo, las muestras deberán ser transferidas inmediatamente a un medio de transporte adecuado tras la colección.

Fijación / Inactivación:

Deberá usarse un porta por paciente. Aplicar la muestra debidamente preparada sobre el porta y dejar que se seque completamente a temperatura ambiente (15-30 minutos, dependiendo del grosor del sustrato). Téngase en cuenta que las muestras que no se hayan secado adecuadamente sobre la superficie estas pueden desprenderse durante el lavado. Después, el porta se somete a una fijación por calor - y/o acetona - y/o formalina (fijación simple, doble o triple). Una vez que el disolvente residual se haya evaporado del porta, la muestra estará lista para la incubación con el anticuerpo antígeno-específico, siendo este anticuerpo primario para la inmunofluorescencia indirecta (IFA) o anticuerpo conjugado fluorescente para la inmunofluorescencia directa (DFA).

CONTROL DE CALIDAD Y BUSQUEDA 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 confirme las reacciones esperadas.

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.

REALIZACIÓN DEL TEST

Los conjugados Biognost® para la inmunofluorescencia directa se suministran listos para el empleo, si no se indica una dilución a aplicar en la etiqueta. Una vez descongelados, los conjugados pueden emplearse en el test directamente. Algunos de los conjugados disponibles son soluciones concentradas, y la dilución a aplicar se indica en la etiqueta. Si no se indica modo de dilución en la etiqueta, se deberá determinar la adecuada dilución del conjugado concentrado (en la etiqueta del conjugado "concentrado de conjugado"). No obstante, el conjugado diluido por el usuario no es estable en periodos prolongados y por ello se deberá realizar cada nuevo test. Para la inmunofluorescencia indirecta, los anticuerpos primarios Biognost® así como los anticuerpos secundarios (conjugados) generalmente se suministran listos para empleo. En caso contrario, la dilución se especifica en la etiqueta.

I. Inmunofluorescencia Directa (DFA):

1. Aplicar los controles y sueros en las áreas de aplicación, cubriendo bien el pocillo (1 o varias gotas).
2. Incubar el porta en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente o mejor a 37°C . Proteger los portas de la luz directa y proximidad de calefactores.
3. Extraer el porta de la cámara húmeda y eliminar aclarando con cuidado con PBS. (No dirigir el chorro directamente al pocillo).
4. 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.
5. Secar los portas con papel absorbente, sin que el sustrato llegue a secarse e inmediatamente a continuación
6. Repartir 2-3 gotas de medio de montaje sobre el porte 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. 2 horas).

II. Inmunofluorescencia Indirecta (IFA):

1. Aplicar los controles y sueros en las áreas de aplicación, cubriendo bien el pocillo (1 o varias gotas).
2. Incubar el porta en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente o mejor a 37°C . Proteger los portas de la luz directa y proximidad de calefactores.
3. Extraer el porta de la cámara húmeda y eliminar aclarando con cuidado con PBS. (No dirigir el chorro directamente al pocillo).
4. 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.
5. Secar los portas con papel absorbente, sin que el sustrato llegue a secarse e inmediatamente a continuación
6. Aplicar el conjugado adecuado (anticuerpo secundario marcado FITC) cubriendo bien el pocillo.
7. Incubar el porta 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda de incubación. Proteger de la luz directa y proximidad de calefactores.
8. Repetir los pasos 3 a 5.
9. Repartir 2-3 gotas de medio de montaje sobre el porte 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. 2 horas).

EVALUACIÓN E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los portas se evalúan bajo un microscopio fluorescente (rango 450- 490 nm) 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.

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. Para un almacenamiento más prolongado, por ejemplo que sean para propósitos educativos, deberán sellarse las juntas con esmalte de uñas transparente y guardarse a -20 °C o menos.

Patrones de fluorescencia:

Para la evaluación se deberá valorar la coloración de las estructuras tisulares del sustrato 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). Una muestra se considera positiva si la fluorescencia que se aprecia es de 1+.

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.

Antígenos objetivos y estructuras objetivo:

Los anticuerpos Biognost® reconocen concretamente las estructuras de antígeno que son características al patógeno a analizar (bacteria, CPE, etc.).

Una fluorescencia de un color verde manzana de alguna de las estructuras del patógeno se considera positiva; solo con la presencia de una sola fluorescencia en la estructura del antígeno es suficiente prueba, de que el paciente esté infectado con el patógeno analizado. En cualquier caso, los resultados siempre deben interpretarse en un contexto general (síntomas clínicos, cuadro clínico, signos, otros análisis serológicos o biopsia).

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

BIBLIOGRAFIA

1. 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
2. Witzleb W.: Grundlagen der medizinischen Mikrobiologie. Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, Verlag Wissenschaftliche Scripten GbR Zwickau, 1991
3. Döhner L.: Virologie. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Verlag Wissenschaftliche Scripten GbR Zwickau, 1991
4. Bundesgesundheitsamt: Laboratoriumssicherheit. Bundesgesundheitsblatt 24, Nr. 22, 1981, 347-359
5. Burkhard F.: Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1991