

Instruções para a utilização do teste ANTIGÉNIO BIOGNOST®

DFA: Detecção de ANTIGÉNIOS pela técnica de IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRECTA: Uma técnica efectuada numa única fase baseada em anticorpos mono ou policlonais marcados com FITC

IFA: Detecção de ANTIGÉNIOS pela técnica de IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA: Uma técnica efectuada em duas fases baseada em anticorpos primários mono ou policlonais e anticorpos secundários marcados com FITC

DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

O Biognost® Ag DFA é um teste por imunofluorescência directa, o Biognost® Ag IFA é um teste por imunofluorescência indirecta para a determinação qualitativa de agentes patogénicos directamente nas amostras de doentes ou após isolamento. O teste Biognost® Ag é para ser utilizado no diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O teste é baseado no método clássico de imunofluorescência. A amostra do doente é primeiro colocada numa lâmina de vidro e submetida a um processo de fixação adequado (cf. secção "Preparação e colheita das amostras"). É posteriormente coberta com um reagente contendo anticorpos com especificidade para um determinado antigénio, ou um FITC (DFA) ou um anticorpo primário não marcado (IFA), e incubada. Em caso de um resultado positivo, os anticorpos mono ou policlonais ligam-se ao antigénio-alvo específico de um determinado micróbio. Os anticorpos em excesso são posteriormente removidos enxaguando a lâmina com o tampão de lavagem fornecido.

No caso do método DFA é colocada uma lamela. No caso do método IFA durante a segunda incubação, todos os anticorpos primários ligados são marcados com anticorpos secundários conjugados com FITC (conjugado). O conjugado em excesso é removido enxaguando a lâmina mais uma vez. A seguir é colocada uma lamela.

Os complexos antigénio/conjugado (DFA) ou antigénio/anticorpo primário/conjugado (IFA) formados são visualizados através de um microscópio de fluorescência com ampliação de 400 a 500 vezes. A sensibilidade e a especificidade do conjugado/anticorpo primário podem ser confirmadas utilizando as correspondentes lâminas de controlo para cada antígeno/conjugado. Não agitar durante a lavagem! Caso contrário o antigénio fixado pode ser danificado ou removido.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste Biognost® por imunofluorescência para antigénios microbianos permite a detecção específica e qualitativa do agente patogénico directamente na amostra do doente ou no isolado microbiano. O resultado positivo do teste estabelece o diagnóstico da infecção provocada pelo agente patogénico em causa, desde que em cada lâmina seja colocada uma única amostra de doente. Em caso de haver mais do que um resultado positivo, com amostras de diferentes doentes analisadas na mesma lâmina (ou em lâminas diferentes, mas que tenham sido colocadas juntas na mesma tina de coloração), os resultados positivos têm que voltar a ser reavaliados. Uma contaminação cruzada entre diferentes amostras aplicadas em diferentes zonas da lâmina pode acontecer durante a lavagem. Nestes casos, todos os resultados positivos têm que ser confirmados individualmente (aplicação de uma única amostra em cada lâmina e em cada tina de coloração).

No entanto, e tal como acontece nos outros métodos de detecção de antigénios, um resultado negativo nunca significa a exclusão da possibilidade de existência de uma infecção pelo agente patogénico considerado. Há sempre a possibilidade do agente infeccioso específico não existir numa determinada amostra colhida para análise ou na sua porção utilizada no teste. Como tal, se for obtido um resultado negativo em situações onde existe uma forte suspeita de uma infecção específica, o teste deverá ser repetido, de preferência numa nova amostra ou o resultado deve ser confirmado num teste serológico ou em cultura.

REAGENTES BIOGNOST® DISPONÍVEIS

DFA: conjugado específico de um agente patogénico marcado com FITC (poli ou monoclonal, pronto a usar ou concentrado), lâminas de controlo, tampão fosfato salino, meio de montagem, lamelas; consultar lista de preços Bios.

IFA: anticorpo específico de agente patogénico (poli ou monoclonal, pronto a usar ou concentrado), anticorpo secundário marcado com FITC, controlos (lâminas de controlo revestidas com antigénio ou lâminas vazias com suspensões positivas e negativas), tampão fosfato salino, meio de montagem, lamelas; consultar lista de preços Bios.

MATERIAL E EQUIPAMENTO ADICIONAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

Pipetas de precisão e pontas para 1-1000 µl. Incubadora (37°C) (opcional)

Agitador Vortex. Tinas de coloração grandes

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

Água destilada ou desionizada. Relógio

Câmara incubadora com humedificação

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 todas as soluções de anticorpos (anticorpos primário ou conjugados) e as lâminas de controlo à temperatura indicada na etiqueta. Para evitar que as lâminas revestidas com antigénio (lâminas de controlo) sequem, as mesmas deverão ser conservadas dentro da embalagem de alumínio devidamente selada. Todos os componentes são estáveis até a sua data de validade indicada na etiqueta, se as recomendações sobre a sua conservação forem rigorosamente cumpridas. Não utilizar nenhum dos componentes após o prazo de validade. O tampão fosfato salino em pó fechado em vácuo, o meio de montagem, as folhas de 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. Todas as amostras de doentes utilizadas em testes de detecção de antigénios são potencialmente infecciosas e devem ser manipuladas com o devido cuidado; e.g., usar luvas descartáveis, máscara e proteção para os olhos (consultar as normas de segurança do laboratório).
2. As soluções de anticorpos (anticorpos primários e conjugados) e o meio de montagem contêm 0.09% azida sódica ou outro conservante. Todos os conservantes são venenosos. 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. Tal como indicado na etiqueta do produto, alguns conjugados contêm o corante azul de Evans. O azul de Evans é um possível carcinógeno (veneno de classe 1* de acordo com a classificação suíça de venenos). Apesar da sua concentração ser muito fraca (max. 0.2 mg/ml), aconselha-se os utilizadores a evitar qualquer contacto destes conjugados com a pele.
4. As regras das Boas Práticas Laboratoriais (regras GLP) deverão ser sempre cumpridas.
5. Amostras e reagentes utilizados durante o teste deverão ser deitados fora obedecendo à legislação em vigor.

PREPARAÇÃO E COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita de amostras, sua estabilização, transporte e preparação para a execução do teste contribuem consideravelmente para a obtenção de bons resultados. Como tal, antes de executar os testes de antigénios Biognost® o laboratório deveria estabelecer um procedimento para a recolha e manuseamento de antigénios (juntamente com médicos e patologistas).

Em caso de infecções gastrointestinais, o antigénio microbiano em causa é determinado melhor em amostras de fezes que podem ser conservadas em formalina a 10%. (Conservação em álcool polivinil ou thimerosal-iodine-formaldehyde não é indicada).

Em caso de infecções respiratórias, a detecção de um antigénio específico é possível em qualquer amostra colhida por um dos seguintes métodos: lavagem broncoalveolar,

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

biopsia broncoscópica, aspiração transtraqueal, saliva (induzida), exsudado da garganta ou nasofaríngeo, punção pleural, autópsia e em cultura (teste confirmatório decultura).

Em caso de utilização de amostras de saliva, a amostra deve ser pré-tratada com dithio-threitol ou N-acetyl cysteina para reduzir a sua viscosidade.

HSV é imediatamente detectável no fluido vesicular ou raspagens vesiculares.

Uma detecção fiável de antígenos microbianos intracelulares só é possível se a amostra colhida conter quantidade suficiente de células infectadas. Para preservar a infectividade microbiana em casos em que é aconselhável uma análise paralela ou a confirmação dos resultados dos testes por cultura celular, as amostras devem ser colocadas num meio de transporte apropriado imediatamente após a sua colheita do doente.

Fixação/Inactivação:

Deve ser utilizada uma lâmina separada para cada doente. Aplicar a amostra devidamente preparada na lâmina e deixá-la secar completamente à temperatura ambiente (15-30 min, dependendo da espessura do substrato). Amostras que não foram deixadas secar na lâmina têm tendência a descolar da lâmina durante as fases de lavagem. De seguida a lâmina é submetida à fixação por calor e/ou acetona e/ou formalina (fixação simples, dupla ou tripla). Quando todo o solvente residual evaporar da lâmina, a amostra está pronta para ser incubada com os anticorpos específicos do antígeno, que tanto poderá ser o anticorpo primário não marcado para a técnica de imunofluorescência indirecta (IFA) ou FITC para a técnica directa (DFA).

Para mais informações sobre a colheita e preparação de amostras para eucariotes consultar a literatura adequada.

CONTROLO DE QUALIDADE E RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Em cada corrida deverão ser colocadas lâminas para o controlo positivo e negativo do antígeno e/ou o conjugado. Se a lâmina de controlo não obtiver a reacção esperada, o teste não é válido e terá que ser repetido. Se as lâminas de controlo não derem os resultados correctos 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 não 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.

RESUMO EXPLICATIVO DO TESTE

Conjugados Biognost® para a técnica de fluorescência directa estão disponíveis prontos a usar, se na etiqueta não for mencionada a necessidade de diluição. Após descongelamento, os conjugados prontos a usar podem ser directamente utilizados na corrida. Alguns dos conjugados estão disponíveis como soluções de conservação concentradas e o procedimento de diluição está indicado na etiqueta. Se a etiqueta não faz referência ao modo de diluição, o utilizador terá que determinar a diluição correcta do conjugado concentrado (a etiqueta do conjugado indica "conjugado concentrado"). No entanto, o conjugado diluído pelo utilizador não é estável por períodos de tempo prolongados e, como tal, a diluição do conjugado deverá ser preparada para cada corrida. Para a técnica de imunofluorescência indirecta, os anticorpos primários Biognost®, tal como os anticorpos secundários (conjugados) são fornecidos prontos a usar. Caso contrário, o modo de diluição está indicado na etiqueta..

I. Teste por Imunofluorescência Directa (DFA):

1. Aplicar na lâmina uma quantidade suficiente (uma ou várias gotas) de conjugado pronto a usar ou devidamente diluído de forma a tapar completamente a amostra do doente fixada.
2. Incubar as lâminas durante 30 minutos à temperatura ambiente ou à temperatura de 37°C (organismos intracelulares) numa câmara de incubação humidificada. Proteger as lâminas de luz solar directa e afastar de fontes de calor.
3. Retirar as lâminas da câmara, secar o excesso de líquidos e enxaguar cuidadosamente com tampão fosfato salino. (Não apontar o jacto do tampão directamente na zona de aplicação!)
4. Imergir as lâminas 2 x 5 min num banho de tampão fosfato salino; utilizar tinas de coloração suficientemente grandes e trocar de tampão entre os ciclos. Não agitar as lâminas durante a imersão no tampão.
5. Secar rapidamente as lâminas com papel absovente. Não deixar secar o substrato. Continuar de imediato com o procedimento de acordo com o ponto 6.
6. Colocar as tampas vertendo 2 ou 3 gotas do 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. 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. Observar de imediato as lâminas num microscópio de fluorescência, para obter melhores resultados. Em alternativa, as lâminas poderão ser guardadas até 24 horas num lugar escuro e fresco. Não deixar secar as lâminas.

II. Teste por Imunofluorescência Indirecta (IFA):

1. Aplicar na lâmina uma quantidade suficiente (uma ou várias gotas) de anticorpo primário de forma a cobrir completamente a amostra do doente fixada.
2. Incubar as lâminas durante 30 minutos à temperatura ambiente ou à temperatura de 37°C (organismos intracelulares) numa câmara de incubação humidificada. Proteger as lâminas de luz solar directa e afastar de fontes de calor.
3. Retirar as lâminas da câmara, secar o excesso de líquidos e enxaguar cuidadosamente com tampão fosfato salino. (Não apontar o jacto do tampão directamente na zona de aplicação!)
4. Imergir as lâminas 2 x 5 min num banho de tampão fosfato salino; utilizar tinas de coloração suficientemente grandes e trocar de tampão entre os ciclos. Não agitar as lâminas durante a imersão no tampão.
5. Secar rapidamente as lâminas com papel absovente. Não deixar secar o substrato. Continuar de imediato com o procedimento de acordo com o ponto 6.
6. Aplicar o conjugado adequado (anticorpo secundário marcado com FITC) à lâmina tal como descrito no ponto 1.
7. Incubar durante 30 min à temperatura ambiente numa câmara de incubação humidificada. Proteger as lâminas de luz solar directa e afastar de fontes de calor.
8. Repetir os passos 3-5 e consultar I., 6.

AVALIAÇÃO

As lâminas são visualizadas numa ampliação de 400 a 500 vezes (vista global numa amplificação de 100x) num microscópio por fluorescência de fundo escuro (filtro: 450-490 nm). 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. As lâminas devem ser observadas no microscópio logo a seguir à última etapa da preparação. Caso contrário, as lâminas preparadas deverão ser guardadas num local escuro e fresco evitando a sua secagem. Para uma conservação a longo prazo, por exemplo se as lâminas forem utilizadas para fins didácticos, têm que ser seladas com verniz transparente nas extremidades da lamela e conservadas à temperatura igual ou inferior a -20°C.

Padrões de coloração por imunofluorescência:

Durante a observação, sómente a coloração das estruturas microbianas típicas deverá ser tida em conta.

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).

Uma amostra é considerada positiva para o agente patogénico investigado se é visível uma fluorescência típica da estrutura típica do agente patogénico classificada de pelo menos 1+.

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.

Antígenos-alvo e estruturas-alvo:

Os reagentes de anticorpos Biognost® detectam especificamente estruturas de antígenos típicas do agente patogénico investigado (bactérias, CPE, etc.). Se o microscópio revelar uma fluorescência claramente visível, verde clara, de tal estrutura de um agente patogénico, a amostra analisada é considerada positiva; a presença de uma única estrutura fluorescente de antígeno é prova suficiente de que o doente está infectado com o agente patogénico investigado.

De qualquer modo, os resultados deverão ser sempre interpretados tendo em conta o contexto geral de toda a informação clínica disponível, o momento da colheita e outros dados laboratoriais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

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