

Instructies voor het gebruik van BIOGNOST® ANTILICHAAM TEST

Het aantonen van IgG, IgM en IgA antilichamen in humaan serum door middel van INDIRECTE IMMUNOFLUORESCENTIE.

Totale analysetijd: 90-120 minuten

DOEL VAN DE TEST

De Biognost® IFT is een indirecte immunofluorescentie test voor de kwalitatieve en/of semi-kwantitatieve bepaling van antilichamen in humaan serum. De Biognost® IFT is bestemd als hulpmiddel bij de in vitro diagnostiek.

PRINCIPE VAN DE TEST

De test is gebaseerd op de klassieke methode van indirecte immunofluorescentie. De objectglasjes zijn gecoat met antigenen (het substraat). In eerste instantie worden de objectglasjes geïncubeerd met het patiëntenserum. De in het serum aanwezige antilichamen zullen binden aan de antigenen waar tegen ze gericht zijn. Niet gebonden antilichamen en andere serum componenten worden vervolgens verwijderd door de objectglasjes te wassen in de bijgeleverde wasbuffer. Tijdens de wasprocedure mag er niet geroerd worden. Om te voorkomen dat de coupe beschadigd of weggewassen wordt! Gedurende een tweede incubatiestap wordt het objectglasje geïncubeerd met FITC gelabelde anti-humaan immunoglobuline (het conjugaat). De overmaat aan conjugaat wordt verwijderd middels een wasprocedure. Het gevormde antigeen/humaan antilichaam/conjugaat complex kan zichtbaar worden gemaakt met behulp van een fluorescentiemicroscop bij een 400 tot 500x vergroting.

Voor het aantonen van specifieke IgM of IgA antilichamen worden de humane sera eerst behandeld met een absorberend reagens (Biosorb®). De IgG en reumafactoren worden op deze wijze verwijderd, waarna de objectglasjes met de humane sera worden geïncubeerd.

BEPERKINGEN VAN DE TEST

De indirecte immunofluorescentietechniek wordt gebruikt voor de detectie van diverse antilichamen in patiëntmateriaal. Omdat de affiniteit van antilichamen voor antigenen nogal kan variëren tussen patiënten onderling, zijn testresultaten moeilijk te standaardiseren. Daarbij komt dat individuele antilichaam titers geen afspiegeling hoeven te zijn van de ernst van de ziekte. Aan de andere kant, aangezien deze techniek is gebaseerd op substraat coupes die (theoretisch) een optimale reeks relevante antigenen presenteren, maakt dit immunofluorescentie uitermate geschikt voor het screenen van antilichamen.

Aangezien er positieve controles met bekende antilichaam titers beschikbaar zijn, kunnen testresultaten semi-kwantitatief worden geëvalueerd. Gebruikers moeten zich echter wel bedenken dat een inschatting van een klinisch beeld niet alleen gebaseerd mag zijn op het testresultaat. Testresultaten moeten altijd geïnterpreteerd worden in relatie met overige relevante informatie (bv. klinische symptomen, tijdstip van bloedafname, andere laboratorium bevindingen, fabrikant specifieke kenmerken van de testbestanddelen en eigen referentiewaarden van de respectievelijke testen) en in samenhang met andere beschikbare patiëntgegevens.

BENODIGDE HULPMIDDELEN (NIET BIJ DE TESTKIT INBEGREPEN)

Geschikte buizen om seriële monsterverdunningen te maken

Precisiepipetten en pipettips met een volume van 1-1000 µl

Vortex mengapparaat

Een 500 of 1000 ml maatcilinder om PBS oplossing te maken

Gedestilleerd of gedemineraliseerd water

Vochtige incubatiebak

Stoof (37°C)

Kleurbakken

Wasfles voor de buffer

Kookwekkertje

Donkerveld fluorescentiemicroscop met filters geschikt voor excitatielicht van 450-490nm en emissielicht van 560-590 nm (voor een optimaal resultaat heeft opvallend excitatielicht de voorkeur boven doorvallend excitatielicht). Gebruik geen immersieolie.

OPSLAG EN HOUDBAARHEID

Bewaar alle objectglasjes, controles, conjugaten en Biosorb® bij de temperatuur die wordt aangegeven op het etiket (5-10°C of bij ≤-20°C). Om te voorkomen dat de coupes op de objectglasjes uitdrogen en denatureren moeten ze worden bewaard in het goed afgesloten aluminiumfolie zakje. Controles, conjugaten en de objectglasjes zijn stabiel tot de houdbaarheidsdatum die wordt aangegeven op het etiket mits de aanbevelingen strikt worden opgevolgd. Gebruik deze bestanddelen niet meer na de houdbaarheidsdatum. Zowel het luchtdicht afgesloten PBS poedermengsel als het afdekmedium, de blotmalletjes en de dekglasjes zijn onbeperkt houdbaar bij kamertemperatuur of bij lagere temperaturen. Al deze onderdelen zijn desondanks voorzien van een houdbaarheidsdatum die op het etiket staat vermeld. Dit is uitsluitend ten behoeve van een gemakkelijke voorraadcontrole. De PBS wasbuffer (pH 7.5) moet op de dag van gebruik vers worden bereid omdat het geen conserveringsmiddel bevat. Indien er na gebruik nog wat buffer resteert wat men de volgende dag wil gebruiken, dan dient dit goed afgesloten te worden bewaard bij 5-10°C. Gooi de PBS buffer weg indien er zich troebeling of verkleuring voordoet, of indien er een vlokkelig neerslag verschijnt of wanneer er een verandering van de pH optreedt.

VEILIGHEID VOORZORGSMAATREGELEN

1. Alle humane sera die gebruikt zijn voor de productie van positieve en negatieve controles zijn getest en negatief bevonden voor HbsAg en antilichamen tegen HIV. Desniettemin moeten deze reagentia beschouwd worden als potentieel infectieus en met de vereiste zorg worden behandeld.
2. Alle vloeibare reagentia zoals controles, conjugaat enz. bevatten 0.09% natriumazide. Natriumazide is giftig. Slik het niet door en vermijd elk contact met de huid en slijmvliezen. Azide bevattende reagentia mogen niet in contact gebracht worden met koper- of loodhoudende voorwerpen, bijvoorbeeld bepaalde afvoerpijpen, omdat dit kan leiden tot de vorming van explosieve metaalazides.
3. Evans Blue is mogelijk carcinogeen (een klasse 1* gif conform de Zwitserse giflijst). Gebruikers worden geadviseerd er voor te zorgen dit niet in te slikken en elk contact van de huid met Evans Blue bevattende oplossingen te vermijden.
4. De veiligheidsbepalingen van de daarvoor ingestelde diensten en van het eigen instituut (laboratorium) dienen strikt te worden opgevolgd (zoals bulletins, laboratorium richtlijnen, veiligheidsinstructies enz.).
5. De huidige Goede Laboratorium Praktijk regels (GLP richtlijnen) moeten altijd worden opgevolgd.
6. Middelen en reagentia die gebruikt zijn voor de test dienen als afval verwerkt te worden overeenkomstig de van toepassing zijnde wettelijke voorschriften.

TESTMATERIAAL

Zowel serum en plasma zijn geschikt voor de test. Serum- en plasmamonsters zijn stabiel gedurende 1 week bij 5-10°C. Indien opslag of herhaald testen van de monsters is vereist gedurende een langere periode dan dienen de monsters te worden uitverdeeld in kleine hoeveelheden (50 µl), snel te worden ingevroren in vloeibare stikstof en opgeslagen bij of lager dan -20°C. Het herhaald invriezen en ontdooien van grotere hoeveelheden sera dient te worden voorkomen omdat dit eiwitaggregatie en aantasting van bepaalde serum- en plasmabestanddelen kan veroorzaken. Serum- en plasmamonsters mogen geconserveerd worden met 0.09% natriumazide mits dit de test niet beïnvloedt (azide beïnvloedt bv de op peroxidase gebaseerde Elisa's). Deze monsters kunnen gedurende een langere periode (tot 1 jaar) worden opgeslagen bij 5-10°C zonder dat het testresultaat terugloopt.

Indien sera moeten worden onderzocht op IgA of IgM antilichamen, dan moeten ze eerst op de juiste manier worden voorbehandeld om vals positieve reacties, veroorzaakt door reumafactoren in combinatie met IgG antilichamen, te voorkomen. Tevens wordt daardoor mogelijke competitie van antigene bindingsplaatsen van IgG, wat zou kunnen leiden tot vals negatieve resultaten, voorkomen. Voor dit doel kan gebruik worden gemaakt van een kant en klaar scheidingsstelsel van Bios (Biosorb®).

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

Ofschoon dit speciaal is geoptimaliseerd voor IgG/IgM scheiding, is dit systeem ook geschikt voor de voorbehandeling van monsters in IgA testen. Het verwijdert een groot deel van het IgG uit het monster terwijl zowel IgM als het grootste deel van het IgA aanwezig blijven. Gedurende deze procedure worden de monsters verdund. De verdunningsfactor voor IgM en IgA is 1:5 en hiermee moet rekening worden gehouden bij de bereiding van de uiteindelijke verdunning die nodig is voor de bepaling.

KWALITEITSCONTROLE EN PROBLEEMOPLOSSING

In elke serie dient voor elke parameter zowel een positieve als een negatieve controle te worden meegenomen. Om de test goed te keuren dient elke controle aan de verwachting te voldoen. De titer van de positieve controle moet overeenkomen met de controlewaarde die vermeld staat op het etiket met een marge van ± 1 tot 2 verdunningsstappen. Als dit niet het geval is controleer dan het volgende: zijn er onderdelen gebruikt voor de test die niet geleverd zijn door Bios® (bv dekglasjes, afdekmedium, enz. van een andere leverancier); was de Biognost® buffer vers gemaakt; zijn er omstandigheden waardoor de fluorescentiemicroscopie niet optimaal functioneert, zoals met olie besmeurde objectieven, niet optimale optische afstelling, zwakke lichtbron; zijn de Biognost® objectglasjes en de Biognost® reagentia correct opgeslagen of zijn er onderdelen gebruikt die reeds verlopen zijn; was de incubatiebak voldoende vochtig (gedurende de incubaties mogen de coupes onder geen enkel voorwaarde indrogen); zijn de objectglasjes gelabeld met een viltstift enz. Forceer nooit het op kamertemperatuur laten komen van reagentia door deze op te warmen. Mogelijke niet-specifieke bindingen van het conjugaat kunnen worden vastgesteld door een blanco controle in de serie mee te nemen; bv PBS kan als patientmateriaal in de testprocedure als blanco controle dienen.

TESTPROCEDURE

Laat eerst de Biognost® objectglasjes, controles en conjugaten op kamertemperatuur komen. Dit duurt ongeveer 5 min. De controles en conjugaten zijn klaar voor gebruik en hoeven dus niet verdund te worden. Voor instructies betreffende het gebruik van het Biosorb® IgG/IgM (IgG/IgA) scheidingssysteem en hieruit voortvloeiend de uiteindelijke monsterverdunning, raadpleeg de betreffende gebruiksaanwijzing Art.nr. S0001tifl. De Biognost® controles zijn, voor zover nodig, reeds voorbehandeld en mogen niet meer blootgesteld worden aan verdere immuunglobulineklassescheiding of absorpties. Het antigeen op de Biognost® objectglasjes is reeds gefixeerd. Het substraat kan vernield worden door een tweede fixatiestap. Raadpleeg de testspecifieke informatie voor de juiste screeningsverdunning en de verdunningen die worden aanbevolen voor uittitratie. Voor de uitvoering van de test (screening of titratie) moeten de monsters op de juiste manier worden verdund met PBS, met of zonder 1% BSA (bovine serum albumine). Voordat men de test uitvoert dienen alle te testen monsters, de bijbehorende verdunningen en parameters overzichtelijk en schematisch op een formulier te worden weergegeven zodat identificatie van de monsters, de bijbehorende verdunningen en parameters na de uitvoering van de test altijd mogelijk is. Dit formulier is de basis voor de interpretatie en documentatie van de testresultaten.

1. Scheur het aluminiumfoliezakje open bij de inkeping en haal voorzichtig het objectglasje er uit. Raak de coupes niet aan. De objectglasjes kunnen het best gemerkt worden met een potlood. Gebruik nooit een viltstift om op de objectglasjes te schrijven.
2. Breng voldoende controlesera of op de juiste wijze verdunde patientsera op, zodanig dat de wells volledig zijn bedekt (tussen 15 en 50 μ l, afhankelijk van de well grootte van de gekozen objectglasjes).
3. Incubeer de objectglasjes gedurende 30 min. bij kamertemperatuur in een vochtige incubatiebak.
IgG/polyspecifieke bepaling: 30 min. bij kamertemperatuur
IgM/IgA bepaling: 30 min. bij kamertemperatuur
IgM/IgA bepaling in geval van intracellulaire micro-organismen (virussen, intracellulaire bacteriën): 30 min. bij 37°C of 60 min. bij kamertemperatuur.
Bescherm de objectglasjes tegen direct zonlicht en houd ze uit de buurt van verwarmingstoestellen.
4. Haal de objectglasjes uit de incubatiebak, laat de overtollige vloeistof van de glasjes afdruppen en spoel de objectglasjes voorzichtig met PBS. (Spuut de buffer niet rechtstreeks op de coupes!)
5. Was de preparaten gedurende 2x5 min in een kleurbakje met PBS; gebruik grote kleurbakjes en ververs de buffer na de eerste 5 min. Gedurende de wasprocedure mag er niet geschud of geroerd worden.
6. Droog de preparaten kort af met de blottmalletjes. Voorkom dat de coupe gedurende deze procedure uitdroogt. Ga daarom onmiddellijk door met stap 7.
7. Breng het juiste conjugaat zodanig op dat de wells volledig zijn bedekt (tussen 15 en 50 μ l, afhankelijk van de well grootte van de gekozen objectglasjes). Een druppel uit de Biognost® gliadine oplossing ampul komt overeen met ongeveer 25 μ l.
8. Incubeer de objectglasjes gedurende 30 min. bij kamertemperatuur in een vochtige incubatiebak. Bescherm de objectglasjes tegen licht en houd ze uit de buurt van verwarmingstoestellen.
9. Herhaal de stappen 4-6. Spoel de preparaten niet met gedestilleerd (of gedemineraliseerd) water.
10. Dek hierna onmiddellijk de glasjes af door 2 of 3 druppels afdekmedium op elk objectglasje aan te brengen en vervolgens, onder vermindering van luchtbelletjes, voorzichtig een dekglas op het objectglasje te plaatsen door het van de ene naar de andere kant te laten zakken. Beoordeel de preparaten met behulp van een fluorescentiemicroscopie. Voor een optimaal resultaat moet dit direct gebeuren. Preparaten mogen gedurende 24 uur worden opgeslagen in een donkere en op een koude plaats en moeten worden beschermd tegen uitdroging. Overtollig afdekmedium moet worden verwijderd met een met PBS bevochtigde tissue om te voorkomen dat de preparaten aan de kruistafel van het microscoop of aan het coupeblad blijven plakken. Raadpleeg voor de EBNA en de anti-gliadine testen de test specifieke informatie.

BEOORDELING VAN DE PREPARATEN EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De objectglasjes worden bekeken bij een 400 tot 500x vergroting onder een donkerveld fluorescentiemicroscopie (overzicht bij een 100x vergroting). Om fluorescentie uitdoving te voorkomen mag er niet langer dan strikt noodzakelijk naar één gezichtsveld van het objectglasje te worden gekeken. Voor een optimaal resultaat dienen er zo veel mogelijk gezichtsvelden snel achter elkaar te worden beoordeeld. Een testserie kan alleen worden geïnterpreteerd indien de meegenomen controles aan de verwachtingen voldoen. Raadpleeg testspecifieke gegevens voor gedetailleerde informatie over beoordeling en interpretatie van de test.

Fluorescentiepatronen:

Bij het interpreteren van de objectglasjes dienen alleen de fluorescentiepatronen van de weefselstructuren of de micro-organismen te worden beoordeeld.

Positief:

Specifieke fluorescentie toont een typische, licht appelgroene kleur en de fluorescentie-intensiteit wordt geschat op een schaal van 1+ (zwak positief), via 2+ (iets meer dan zwak positief), 3+ (positief) naar 4+ (sterk positief).

Negatief:

Een fluorescentie intensiteit van minder dan 1+ wordt als negatief beschouwd. Geelachtige of donkergroene fluorescentie is aspecifiek en moet buiten beschouwing worden gelaten.

Titer:

Titers worden gerapporteerd als de reciproke waarde van de hoogste serumverdunning met een fluorescentie-intensiteit van tenminste 1+. Voorbeeld, als de 1:80 verdunning was geschat op 1+ terwijl de 1:160 verdunning als negatief was beoordeeld, dan zou de titer van dit patiëntenmonster worden gerapporteerd als 80.

REFERENTIES

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