

INSTRUKCJA UŻYCIA

**ABSORBENTÓW BIOSORB®****I. Izolacja IgM i IgA, przez oddzielenie IgG, przy użyciu antyludzkiej surowicy IgG, stosowana do wszystkich oznaczeń IgM i IgA:**

Absorbent Biosorb® IgG, 48 separacji, numer katalogowy 90-1048

Absorbent Biosorb® IgG, 120 separacji, numer katalogowy 90-1120

II. Oddzielanie grupy specyficznych przeciwciał przeciwko krętkom, przy użyciu krętka homogenizowanego Treponema phagedenis, właściwych do oznaczeń IgG dla Boreliozy i Leptospirozy

Absorbent wielokrotnego użycia Biosorb®, numer katalogowy 36-6105

PRZEZNACZENIEAbsorbenty Biosorb® usuwają immunoglobuliny przeszkadzające oznaczeniu IgM lub IgA, lub testowi na przeciwciała przeciwko krętkowi w ludzkiej surowicy. Należy go używać tylko w diagnostyce *in vitro*.**WPROWADZENIE****Izolacja IgM i IgA**

Bezpośrednie oznaczanie IgM lub IgA w surowicy ma kilka wad, jeśli jest obecny specyficzny patogen IgG. Stwierdzenie to jest przeważnie prawdziwe, jeśli stężenie antygenów właściwych, dla IgM i IgA jest niskie w porównaniu do stężenia antygenów właściwych dla IgG. IgG może interferować z oddziaływaniami antygenów z IgM i IgA, przez konkurowanie o miejsca wiązania się do antygeny (steryczne przeszkody). Może to prowadzić do zmniejszenia inhibowania łączenia IgM/IgA i fałszować w ten sposób wyniki. Z drugiej strony, czynnik reumatoidalny IgM, obecny w surowicy pacjenta, może powodować fałszywie pozytywne wyniki testów IgM. Czynnik reumatoidalny IgM jest autoprzeciwciałem IgM bezpośrednio przeciwko przeciwciałom IgG (w kompleksie immunologicznym). Jeżeli właściwe IgG jest związane z antygenem, czynniki reumatoidalny IgM może wiązać się do „zaktywowanego” IgG i może być wykryty przez właściwy koniugat IgM. Przez analogię, czynnik reumatoidalny IgA może wpływać na testy IgA. Aby wyeliminować te problemy IgG musi zostać usunięty z próbki. Dopiero wtedy, wyizolowane IgM i/lub IgA mogą być testowane na odpowiednie patogeny. Wstępna obróbka próbek przy użyciu antyludzkiej antysurowicy IgG (**Absorbent Biosorb® IgG, numer katalogowy 90-1048 i 90-1120**) dostarcza prostej, szybkiej i efektywnej metody. Ludzkie cząsteczki IgG zostają związane w stabilny immunokompleks (do usunięcia nie jest potrzebna wirówka), który już nie blokuje miejsc wiązania IgM/IgA, co przeciwdziała otrzymaniu wyników, fałszywie negatywnych. Pośrednio, również obecne czynniki reumatoidalne nie będą już prowadziły do fałszywie pozytywnych wyników.

Serologia Krętków

Serologia krętków (*Treponema pallidum*, Boreliozy i Leptospirozy) jest kompleksowa. Surowice pacjentów zainfekowane jednym z tych patogenów, lub mające tylko kontakt z apatogenicznymi członkami grupy krętków, prezentują często krzyżowe reakcje (również o wysokich mianach), kiedy są testowane z heterogenicznym antygenem, ze wspomnianej grupy. Oczywiście reakcje krzyżowe (powszechne) antygenów krętka (epitopów) są silnie immunogenne tzn., że tworzone są regularnie, przeciwciała szczególnie przeciwko tym antygenom/epitopom. Dlatego różnicowanie zaangażowanych patogenów tylko przez serologię jest trudne, a nawet niemożliwe.

Aby zwiększyć specyficzność serotestów na przeciwciała przeciwko krętkom, próbki pacjentów powinny być wstępnie potraktowane absorbentami (**Absorbent wielokrotnego użycia Biosorb®, numer katalogowy 36-6105**), które w dużym stopniu, usuwają krzyżowe reakcje przeciwciał. Jednak czułość testów na przeciwciała przeciwko krętkom jest zmniejszona przez ten pomiar. Miana właściwych przeciwciał mogą być zmniejszone bardziej lub mniej, przez potraktowanie surowicy wielokrotnie krętkiem.

ZAWARTOŚĆ I ZASADA DZIAŁANIA TESTU**Antyludzki system bazujący na IgG:**

Surowica rozcieńczenie po obróbce 1:5. Stosowana do wszystkich IgG/IgM lub IgG/IgA separacji, dla wszystkich metod (IFA, Elisa, Blot itd.)

Numer katalogowy 90-1048: dla 48 próbek pacjentów (separacja), gotowe do użycia; 2ml.**Numer katalogowy 90-1120:** dla 120 próbek pacjentów (separacja), gotowe do użycia; 5ml.

Traktowanie próbek pacjenta przy użyciu odczynnika ludzkich cząsteczek IgG Biosorb® z próbki surowicy będzie skompleksowane z antysurowicą anti-IgG. Ustabilizowane cząstki IgG nie mogą przeszkadzać reaktywności IgM i IgA w teście. Po zastosowanie Absorbentu Biosorb®, surowica może być użyta bezpośrednio lub rozcieńczona buforem PBS do IFA lub do ELISA buforem rozcieńczającym itd. Aż do końcowego rozcieńczenia.

Wielokrotny Absorbent Biosorb®:**Numer katalogowy 36-6105:** System bazujący na homogenizowanym *Treponema phagedenis*; gotowy do użycia; 1 ml.

Po zastosowaniu absorbentu, rozcieńczony w próbce surowicy 1:5.

Obróbka surowicy pacjenta wielokrotnym absorbentem Biosorb®, usuwa przeciwciała bezpośrednio przeciwne do powszechnego antygeny krętka. Ten *Treponema phagedenis* jest również stosowany we wszystkich testach w serologii krętków, niezależnie od metody (IFA, ELISA Blot itd.) czy producenta (rodzina Borelii, FTA-ABS, rodzina Leptospirozy).

MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

Odpowiednie pojemniki do przeprowadzenia absorpcji.

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

Mikrowytrząsarka np. typ Vortex

Bufor PBS

Stoper z Timerem

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Należy przechowywać Absorbent w temperaturze 5-10°C. Nie ogrzewać. Chronić przed promieniami słonecznymi. Jeśli ściśle przestrzega się zaleceń, Absorbenty są stabilne aż do terminu przydatności podanego na etykiecie.

ŚRODKI BEZPIECZEŃSTWA

1. Absorbenty są przeznaczone tylko do diagnostyki *in vitro*.
2. Absorbenty 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. Należy ściśle przestrzegać przepisów bezpieczeństwa stowarzyszeń zawodowych oraz odpowiednich instytutów (laboratoriów) - (patrz uwagi, wytyczne dla laboratoriów, instrukcje bezpieczeństwa itp.).
4. Wytyczne Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP), powinny być zawsze przestrzegane.
5. 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. Próbkę 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 cyklowi 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% azydku sodu jeśli nie będzie to kolidować 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.

KONTROLA JAKOŚCI ORAZ USUWANIE PROBLEMÓW

Absorbenty nie mogą być doprowadzane do temperatury pokojowej przez ogrzewanie. Potraktowanie surowic absorbentem wielokrotnego użycia, usunie krzyżowo reagujące przeciwciała (przeciwciała genowo-właściwe dla antygeny krętka). Specyficzność testu będzie zwiększona po zastosowaniu tej procedury, ale czułość zmniejszy się. Fakt ten musi być brany pod uwagę, jeśli porównuje się wyniki z próbki surowicy pod absorpcji z surowicami, gdzie nie stosowano absorpcji. Przygotowanie odpowiedniego testowego rozcieńczenia surowicy i pierwsze rozcieńczenia surowicy poprzedzające absorpcję, muszą być również wzięte pod uwagę. Czułość testów i ich specyficzność są stale monitorowane w laboratorium kontrolnym Bios®, aby upewnić się, co do poprawnego przeprowadzenia testów. Bios® stosuje wszystkie surowice i standardy kontrolne, udostępniane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) i inne oficjalne instytucje do standaryzacji testów. Dostarczone próbki kontrolne negatywne i pozytywne są skalibrowane zgodnie ze standardami lub surowicami od scharakteryzowanych klinicznie pacjentów lub dostępnych dawców krwi.

PROCEDURA ABSORPCJI

Należy pozwolić dojść wszystkim odczynnikiem i surowicom do temperatury pokojowej, przed absorpcją (około 10 minut). Po osiągnięciu tej temperatury, należy delikatnie poruszyć 2 lub 3 -krotnie butelką do góry i do dołu, przed użyciem, aby wymieszać zawieszony białek.

Zastosowanie Absorbentów IgG Biosorb® do usuwania IgG w testach Igm lub IgA:

1. Rozcieńczyć surowicę pacjenta 1:5 z odczynnikiem Biosorb® (np. wymieszać 10 µl próbki surowicy z 40 µl Biosorb®). Wstawić Biosorb® z powrotem do lodówki
2. Użyć wytrząsarki do wymieszania próbki
3. Inkubować mieszaninę w temperaturze pokojowej przez 10-15 min. Przykryć mieszaninę parafilmem.
4. Po inkubacji, mieszanina (frakcja IgM/IgA, rozcieńczenie surowicy 1:5) może być natychmiast użyta do testów IgM/IgA lub rozcieńczona buforem PBS do IFA, buforem rozcieńczającym do ELISA, lub innym odpowiednim buforem do końcowego rozcieńczenia. Wirówka nie jest potrzebna.
5. Nie należy stosować Biosorb® do pozytywnych próbek kontrolnych Bios®. Nasze próby pozytywne, zostały wystarczająco obrobione w naszym laboratorium.
6. Gdy planowane jest rozcieńczenie surowicy, wcześniejsze rozcieńczenie próbki pacjenta na etapie absorpcji, musi być wzięte pod uwagę.

Zastosowanie Absorbentów wielokrotnego użycia Biosorb® do absorpcji przeciwciał genowo odpowiednich do krętka w oznaczeniach IgG:

1. Rozcieńczyć surowicę pacjenta 1:5 z absorbentem wielokrotnego użycia Biosorb® (np. wymieszać 10 µl próbki surowicy z 40 µl Absorbentu wielokrotnego użycia Biosorb®). Wstawić Absorbent wielokrotnego użycia Biosorb® z powrotem do lodówki
2. Użyć wytrząsarki do wymieszania próbki
3. Inkubować mieszaninę w temperaturze pokojowej przez 10-15 min. Przykryć mieszaninę parafilmem.
4. Mieszanina może być rozcieńczona z buforem PBS dla metody IFA, z rozcieńczającym buforem dla ELISA lub innym odpowiednim buforem do końcowego rozcieńczenia lub rozcieńczenia wymaganego lub używanego bezpośrednio do testów. Usunięcie immunokompleksu, poprzez odwirowanie nie jest wymagane.
5. Nie stosować wielokrotnego absorbentu Biosorb® do pozytywnych próbek kontrolnych krętka Bios®. Nasze próby pozytywne, zostały wystarczająco obrobione w naszym laboratorium.
6. Gdy planowane jest rozcieńczenie surowicy, wcześniejsze rozcieńczenie próbki pacjenta na etapie absorpcji, musi być wzięte pod uwagę.

Jeżeli separacja IgG/IgM, IgA przy użyciu absorbentu IgG Biosorb® jest przeprowadzona przed absorpcją (frakcji IgM/IgA) przy użyciu Absorbentu wielokrotnego użycia, wymagana jest mniejsza ilość Absorbentu wielokrotnego użycia (np. jedna część frakcji IgM i jedna część Absorbentu wielokrotnego użycia). Ogólne stężenie przeciwciał w próbce jest już pomniejszone przez pierwszy krok absorpcyjny. Rozcieńczenie próbki po obu etapach absorpcji wynosi 1:10 (1:5 i 1:2).

LITERATURA

1. Feldner J.: RF-Absorbens: IgM-Antikörperbestimmung ohne Rheumafaktor-Interferenz. Lab.med. 14, 1990, 283-288
2. Hunter E.F., Deacon W.E., Meyer P.F.: An Improved Test for Syphilis, the Absorption Procedure (FTA-ABS). Publ. Health Rep. 79, 1964, 410-412

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® und Recipe® sind registrierte Warenzeichen der Firma Bios® GmbH Labordiagnostik, Deutschland.

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Bios GmbH.

Unsere Gebrauchsinformationen sind geistiges Eigentum der Firma Bios und nur nach unseren Vorgaben zu verwenden.

Bios® GmbH Labordiagnostik, Hofmannstr. 5-7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/78020599-0/-40, e-mail: bios@bios-world.com, Biosite® www.bios-world.com