

MegaFLUO® PBS

ad us. vet.
In vitro Diagnostikum

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)-Tabletten für den indirekten semi-quantitativen Immunfluoreszenz-Nachweis spezifischer IgG / IgM-Antikörper

GEBRAUCHSINFORMATION



6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMATIONEN ZUM TESTKIT

TESTKITKOMPONENTEN

1 Packung MegaFLUO® PBS enthält:

- 1, 10 oder 20 Tabletten PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung), pH 7,2–7,4
- 1 Gebrauchsinformation

PROBENMATERIAL

Serum oder Plasma

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Die Lagertemperatur für die PBS-Tabletten beträgt +15–25°C
- Die Haltbarkeit der Tabletten beträgt 36 Monate ab Herstellung.
- Die Haltbarkeit der fertigen Lösung beträgt 12 Monate bei +4°C.

NOTWENDIGES, NICHT IM TESTKIT ENTHALTENES MATERIAL

MegaFLUO® Objektträger, Positivkontrolle, Negativkontrolle, FITC Anti-Spezies-IgG/IgM-Konjugat, Mounting Medium, Gefäß zum Waschen mit PBS, Reaktionsgefäße für Serumverdünnungen, Mikroliterpipetten, 24×50 mm Deckgläser, Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Anregungswellenlänge 465–495, Grenzfiter 515–555) und 400× Vergrößerung, Brutschrank mit 37°C, feuchte Kammer.

ANWENDUNGSGEBIET

Dieses Produkt ist als Reagenz für den Indirekten Fluoreszenz-Nachweis spezifischer Antikörper (IFAT) geeignet.

HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

SYMBOLERKLÄRUNG

- Lagerung
15–25°C – siehe Etikett
- Für den tierärztlichen Gebrauch
- In vitro Diagnostikum
- Gebrauchsinformation genau beachten
- Verwendbar bis – siehe Etikett
- Chargen-Bezeichnung
- Keine Reagenzien verschiedener Testkits, Chargennummern oder mit abgelaufenem Verfallsdatum verwenden.

2. TESTPRINZIP

Seren werden mit PBS (pH 7,2–7,4) entsprechend verdünnt und auf die Antigenfelder aufgebracht, um im Fall einer positiven Probe eine Antigen-Antikörperbindungsreaktion bei 37°C zu ermöglichen. Durch anschließendes Spülen mit PBS werden nicht-gebundene, unspezifische Serumproteine abgewaschen. Im nächsten Schritt wird das fluoreszinmarkierte FLUO FITC Anti-Spezies-IgG/IgM-Konjugat aufgebracht, welches an die Antigen-Antikörperkomplexe bindet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wird nicht-gebundenes Konjugat mit PBS abgespült. Abschließend werden die Antigenfelder mit Eindeckmittel und Deckglas abgedeckt. Die Beurteilung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop (Filtersystem für FITC) bei 400× Vergrößerung.

3. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Stellen Sie sicher, dass die exakte Zuordnung der Testkitkomponenten zum jeweiligen Patienten gewährleistet ist.
- Für jede Probe bzw. Verdünnung eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Das Konjugat ist photosensitiv und wärmeempfindlich, deshalb sollte es bis kurz vor Testung in Dunkelheit bei 2–8°C gelagert werden.
- Das Konjugat enthält Evans-Blau als Farbstoff, das potentiell krebserregend ist. Hautkontakt und Ingestion sind unbedingt zu vermeiden.
- Das Probenmaterial, die Kontrollen und die Objektträger müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.

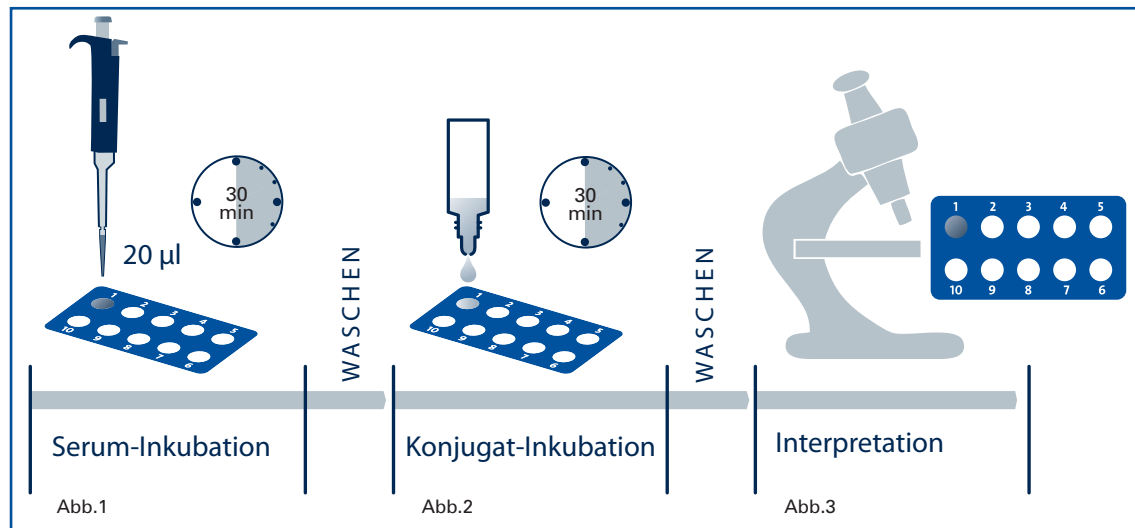
4. WICHTIGE ZUSATZINFORMATIONEN ZUR TESTAUSWERTUNG

Seroprävalenz

Der Cut-Off kann je nach Region sowie Probenherkunft (Abhängigkeit von der Prävalenz und des Endemie-Status) variieren. Daher wird jedem Labor empfohlen, den individuellen Cut-Off selbst festzulegen.

Eine akute Infektion (2- bis 4-facher Titeranstieg: „Serokonversion“) kann nur durch eine Titerbestimmung eines Serumpaars (2 Proben im Abstand von 2–3 Wochen) bestimmt werden.

Darüberhinaus sind die Testergebnisse grundsätzlich in Verbindung mit der Anamnese, der Klinik sowie mit zusätzlichen Laborparameter zu interpretieren.



5a. HERSTELLUNG DER PBS-LÖSUNG

1. PBS-Tablette in etwa 50–100 ml Aqua dest. unter Rühren (Magnetrührer) auflösen. Anschließend auf das finale Volumen von 1000 ml auffüllen und bis zur vollständigen Durchmischung weiterverrühren.
2. Sterilisieren durch Filtration oder Autoklavieren. Den Puffer in eine sterile Flasche durch einen 0,22 µm-Filter filtrieren oder für 15–20 Minuten autoklavieren und bei 4°C lagern.
3. Der Puffer ist nun gebrauchsfertig.

5b. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die Testkitkomponenten (außer Konjugat!) und die zu testenden Seren sollten zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben.
2. Stellen Sie entsprechende Verdünnungen (siehe Gebrauchsinformation für den jeweiligen Test) mit PBS für alle zu testenden Seren her. Für Seren, welche in einem früheren Test positiv beurteilt wurden, empfiehlt es sich, 2-fach-Serienverdünnungen mit PBS herzustellen, um den Endtiter (= höchste, noch positive Verdünnung) zu bestimmen.
3. Entnehmen Sie die Objektträger vorsichtig der Verpackung und legen Sie sie in die feuchte Kammer. Tragen Sie auf jeden Objektträger 1 Tropfen (20 µl) der Positiv- und Negativkontrolle auf separate Antigenfelder auf. Pipettieren Sie von jeder Serumverdünnung ebenfalls 20 µl auf separate Antigenfelder (Abb.1). Achten Sie darauf, dass die Antigenfelder vollständig benetzt sind.
4. Inkubieren Sie für 30 Minuten bei 37°C.
5. Waschschrift: Klopfen Sie die Serumverdünnungen vorsichtig ab und schwenken Sie die Objektträger 5 Minuten in PBS. Wiederholen Sie den Schritt für weitere 5 Minuten in frischem PBS. Spülen Sie anschließend die Objektträger **kurz** mit dest. Wasser ab. Klopfen Sie vorsichtig überschüssiges Wasser ab und trocknen Sie gegebenenfalls vorsichtig die Teflonbeschichtung zwischen den Antigenfeldern mit saugfähigem Papier oder Wattestäbchen. Lassen Sie jedoch die Antigenfelder nicht austrocknen!
Sollten Sie zum Waschen eine Spritzflasche verwenden, richten Sie den Strahl nicht direkt auf die Antigenfelder.
6. Legen Sie die Objektträger zurück in die feuchte Kammer und tragen Sie sofort auf jedes verwendete Antigenfeld 1 Tropfen FLUO FITC Anti-Spezies-IgG/IgM-Konjugat auf (Abb.2). Achten Sie darauf, dass die Antigenfelder vollständig benetzt sind.
7. Inkubieren Sie für 30 Minuten bei 37°C und in Dunkelheit, um das photosensitive Konjugat zu schützen.
8. Wiederholen Sie den Waschschrift, wie in Punkt 5 beschrieben.
9. Geben Sie einige Tropfen Eindeckmittel auf Deckgläser und legen Sie diese vorsichtig auf die Objektträger. Versuchen Sie, etwaige Luftblasen vorsichtig herauszudrücken.
10. Werten Sie die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop bei 400× Vergrößerung aus (Abb.3), indem Sie die Fluoreszenzmuster der Proben mit denen der Positiv- bzw. Negativkontrolle vergleichen.
11. Versiegelte Objektträger können bei 2–8°C im Dunkeln bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

6. TESTAUSWERTUNG

Für die Auswertung wird ein Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtersystem für FITC (Anregungswellenlänge 465–495, Grenzfiter 515–555) und einer Vergrößerung von 400× benötigt.

Die Fluoreszenzbilder (Form, Dichte etc.) der Negativ- und Positivkontrolle gelten grundsätzlich als Referenzbilder. Davon abweichende Reaktionsmuster sind als unspezifisch, sprich negativ zu bewerten!

Positives Testergebnis

Eine positive Reaktion zeigt sich durch eine deutliche gelbgrüne Fluoreszenz der nachzuweisenden Erreger.

Es empfiehlt sich, positive Proben weiter zu verdünnen, um den Endtiter (= höchste, noch positive Verdünnung) zu bestimmen.

Cut-Off-Fluoreszenzbild / Empfohlener Cut-Off

Die Erreger zeigen eine geringe (1+), gelbgrüne Fluoreszenz.

Negatives Testergebnis

Keine gelbgrüne Fluoreszenz sichtbar.

Abweichende fluoreszierende Reaktion

Andere Fluoreszenzmuster als die beschriebenen sind als unspezifische Reaktion und daher als negativ zu bewerten.

Abbildungen finden Sie unter <http://www.megacor.at>

MegaFLUO® PBS

ad us. vet.
In vitro diagnosticum

PBS (Phosphate buffered saline) tablets for the indirect semiquantitative immunofluorescence detection of specific IgG/IgM antibodies

INSTRUCTIONS FOR USE



6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMATION ON THE TEST-KIT

TEST-KIT COMPONENTS

1 package MegaFLUO® PBS contains:

- 1, 10 or 20 PBS (phosphate buffered saline) tablets, pH 7.2–7.4
- 1 instructions for use

SAMPLE MATERIAL

Serum or plasma

STORAGE AND STABILITY

- The storage temperature for the PBS tablets is +15–25°C
- Shelf life of tablets: 36 months after manufacturing.
- Shelf life of reconstituted solution: 12 months at +4°C

MATERIAL REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

MegaFLUO® Slides, Positive Control, Negative Control, FITC anti-species IgG/IgM conjugate, Mounting Medium, washbasin for PBS, test tubes for serum dilutions, microlitre pipettes, 24x50 mm cover slips, fluorescence microscope with filter system for FITC (fluorescein isothiocyanate, excitation wavelength 465–495, barrier filter 515–555) and 400× magnification, 37°C incubator, humid chamber.

INDICATED USE

This product is suitable as reagent for indirect immunofluorescence detection of specific antibodies (IFAT).

LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

2. TEST PRINCIPLE

Sera are diluted in PBS (pH 7.2–7.4) and dropped onto the slide wells to allow an antigen-antibody reaction at 37°C in the case of a positive sample. By subsequent washing with PBS, non-bound unspecific serum proteins are washed off. In the next step, fluorescein-marked FLUO FITC anti-species IgG/IgM conjugate is added which binds to the antigen-antibody complexes. After an incubation time of 30 minutes, non-bound conjugate is washed off with PBS. Finally, the wells are covered with Mounting Medium and cover slip. Evaluation is done with a fluorescence microscope (filter system for FITC) with 400× magnification.

3. PRECAUTIONS FOR USERS

- Make sure that the test-kit components can be correlated exactly to the particular patient.
- Use a new pipette tip for each sample or dilution.
- The conjugate is photosensitive and sensitive to heat, therefore it should be stored in the dark at 2–8°C.
- The conjugate contains Evans-blue dye, which is potentially carcinogenic. Avoid ingestion and skin contact.
- The sample material, the controls and the slides must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly after test procedure, together with the used test-kit components.

4. IMPORTANT ADDITIONAL INFORMATION FOR TEST EVALUATION

Seroprevalence

The cut-off can vary depending on the region and the origin of the sample (dependent on the prevalence and on the state of endemicity). Therefore, it is recommended for every laboratory to determine an individual cut-off.

An acute infection (2- to 4-fold titre increase) can only be determined by the titre determination of a coupled serum test (2 samples in an interval of 2–3 weeks).

The interpretation of test results should always be based on anamnestic and especially clinical data and additional laboratory parameters.

5a. PREPARATION OF THE PBS SOLUTION

1. Dissolve the PBS tablet in ca. 50–100 ml aqua dest by stirring (magnetic stirrer). Adjust the volume to 1000 ml and stir until full dissolution.
2. Sterilise by filtration or autoclaving. Filter the buffer into a sterile flask through a 0.22 µm filter or autoclave for 15–20 minutes and keep at +4°C.
3. The buffer is now ready to use.

5b. TEST PROCEDURE

1. The test-kit components (apart from conjugate!) and the sera to be tested should have room temperature at the time of application.
2. Prepare appropriate dilutions (see instructions for use for the specific test) with PBS for all sera to be tested. For sera found positive on a previous test it is recommended to prepare serial two-fold dilutions in PBS to determine the endpoint titre (= highest dilution that is still positive).
3. Carefully remove the slides from their foil pouch shortly before use and place them into the humid chamber. Apply 1 drop (20 µl) of the Positive and Negative Control on each slide on separate antigen wells. Pipette 20 µl of every serum dilution on separate antigen wells (fig.1). Take care that the antigen wells are completely covered.
4. Incubate for 30 minutes at 37°C.
5. Washing step: Tap remaining serum dilutions gently from the slides and shake the slides gently for 5 minutes in PBS. Repeat this step for another 5 minutes with fresh PBS. Briefly rinse the slides with distilled water. Tap remaining water gently from the slides and, if necessary, dry the teflon mask between the wells with absorbent paper or cotton bud sticks. However, do not allow the antigen wells to dry out!
If using a washing bottle, do not focus the stream directly onto the antigen wells!
6. Place the slides back into the humid chamber and immediately drop 1 drop of FLUO FITC anti-species IgG/IgM conjugate onto each used well. (fig.2). Take care that the antigen wells are completely covered.
7. Incubate for 30 minutes at 37°C and in the dark to protect the photosensitive conjugate.
8. Repeat washing step as described in step 5.
9. Add some drops of Mounting Medium on the cover slips and place them carefully on the slides. Try to remove any possible bubbles carefully.
10. Evaluate the slides using a fluorescence microscope at 400× magnification (fig.3), comparing each well to the fluorescence pattern seen in the Positive and Negative Controls.
11. Sealed slides can be stored at 2–8°C in the dark for up to 7 days.

6. TEST EVALUATION

For the evaluation, a fluorescence microscope with a filter system for FITC (excitation wavelength 465–495, barrier filter 515–555) and 400× magnification is required.

The fluorescence pattern (form, density etc.) of the Negative and Positive Control is considered as reference pattern. Patterns of reactivity different than that seen in the Controls must be considered non-specific, which means negative!

Positive test result

A positive reaction is shown as bright, sharp and clear, yellow-green fluorescence of the pathogen to be detected.

A further dilution of the positive samples is recommended to determine the endpoint titre (= highest dilution that is still positive).

Cut-off fluorescence pattern / recommended cut-off

The pathogen shows a weak (1+) yellow-green fluorescence.

Negative test result

No yellow-green fluorescence visible.

Divergent fluorescent reaction

Reactivity patterns different than the described ones must be considered as non-specific reactions and therefore as negative.

Images are shown at <http://www.megacor.at>

EXPLANATION OF SYMBOLS

- Store at 15–25°C – see label
- For veterinary use only
- In vitro diagnosticum
- Follow instructions for use precisely
- Expiry date – see label
- Lot number
- Do not use test-kit components from different kits, lot numbers or beyond stated expiry date.

