



Praktické pokyny pro provádění imunofluorescenční techniky

- 1. IFA sklíčka by měly být skladovány v chladničce (2-8 °C). Nikdy je nezmrazujte. Nikdy je neponechávejte příliš dlouho mimo chladničku.**
 - Jsou-li sklíčka zmrazené, některé mukózy a struktury jsou deformované (roztažené) nebo polámané, a proto uvolňují antigeny. To se často projevuje nespecifickou fluorescencí a vysokou fluorescencí pozadí. Zvláštní pozornost je třeba věnovat buňkám HEp-2 a měkkým tkáním (slinivka, nadledviny, štítná žláza...).
 - Jsou-li sklíčka ponechané příliš dlouho při teplotě nad 2-8 °C, zahřáté, vystavené příliš dlouho přímému slunečnímu světlu atd., mohou se některé proteiny (antigeny) uvolnit, a tím zvýšit nespecifické hydrofobní interakce, které by zvýšily fluorescenci pozadí a snížily citlivost testu (kvůli poklesu intenzity fluorescence).
- 2. Dbejte na to, abyste používali sklíčka před uplynutím jejich doby záruky.**
 - Tkáně na sklíčkách jsou organickým materiálem, a tedy citlivé na působení času. Použití destiček po uplynutí záruky znamená, že některé antigeny mohou být v průběhu času zničeny, což může způsobit fluorescenci pozadí a nedostatek citlivosti.
- 3. Po otevření balení používejte vždy celá sklíčka, i když ponecháte některé jamky prázdné.**
 - Sklíčka jsou skladována v suché dusíkové atmosféře. Po otevření balení již tyto podmínky nejsou zachovány, a proto je tkáň vystavena účinku okolního prostředí: oxidaci, vlhkosti, extrémnímu suchu. Je-li tkáň poté skladována, projevují se tyto vlivy v potenciálním úbytku antigenů, což má dále za následek snížení citlivosti a zvýšení fluorescence pozadí.
 - Z těchto důvodů nedoporučujeme používání „zlámaných“ nebo „nařezaných“ destiček. Navíc při řezání skla se vždy nějaký prach z řezu dostane na tkáň, což má za následek zkraslené zobrazení v mikroskopu.
- 4. Přesvědčte se, že vzorek je „čistý“: bez prachu, bakteriální kontaminace atd. Je-li vzorek lipemický, před použitím jej protřepejte a odeberte alikvot čistého séra.**
 - Všechny nečistoty ve vzorku jsou zdrojem interferencí při čtení pod mikroskopem. S lipemickými vzorky je třeba manipulovat opatrně, protože riziko nespecifických hydrofobních interakcí je vyšší než u čistých vzorků.
 - Není-li možné testovat sérum krátce po extrakci, doporučujeme odebrat jeho alikvoty ve zmrazeném stavu při -20 °C. Snažte se vyhnout střídavému zmrazování a roztávání vzorků. Může dojít k proteinové denaturalizaci.
- 5. Při vkládání vzorku do jamky zajistěte, aby se vzorek rozprostřel po celé jamce.**
 - Nejsou-li některé oblasti tkáně v kontaktu se vzorkem, nedojde k reakci antigen – protilátka, takže se některé oblasti tkáně budou jevit pozitivní a jiné naopak negativní.
 - Na okraji kapky se mohou na tkáni objevit určité trhlinky způsobené různými hladinami hydratace na každé straně kapky. Tyto trhlinky by mohly být špatně interpretovány jako závada tkáně.
 - Tento jev je obzvláště kritický u tkání jako RL/RK/RS a pokrývá prakticky celou jamku.
- 6. Ihned po vložení vzorku umístěte sklíčko na 30 minut do vlhké komůrky, abyste předešli vysušení jamky kvůli vypařování vzorku.**
 - Vypařování vzorku znamená, že proteiny se na tkáni vysráží. Kvůli nárůstu hydrofobních interakcí je velmi obtížné je vymýt. Následkem je vysoká fluorescence pozadí.
 - Velmi jednoduchou vlhkou komůrku lze připravit v Petriho misce s vlhkým papírovým ubrouskem uvnitř.

- Teplota není rozhodující, skladujeme-li vzorky při pokojové teplotě (20-25 °C).
- Doba není rozhodující, necháme-li vzorek dostatečnou dobu reagovat s tkání/buňkami.

7. Přebytek vzorku odstraňte několika kapkami čistého pufru.

- Zabraňte křížové kontaminaci mezi jamkami.
- Kapky by měly být do jamky přidány tak, aby nevytvářely nadměrný tlak na tkáň (mohla by se oddělit od sklíčka).
- Je třeba přidat dostatečné množství pufru, aby bylo zajištěno, že prakticky celý vzorek bude odstraněn z jamky.

8. Sklíčka omývejte dvakrát, vždy nejméně 5 minut.

- Při každém promytí používejte čistý pufr. Zbytkové interference v pufru by jinak mohly reagovat s tkání a vyvolat nespecifickou fluorescenci. Navíc interferující látky z sklíčka neodstraníme, není-li pufr čistý.
- Protože pufr obsahuje fosfát, dbejte, aby se mikroskopické krystaly monofosfátové soli vytvořené během skladování při teplotě 2-8 °C dostatečnou dobu rozpouštěly při pokojové teplotě.
- Prodloužení doby promytí není rozhodující.

9. Osušte barvu vymezující jamku vhodným savým papírem a ihned přidejte konjugát.

- Pracujte vždy pouze s jednou destičkou! Vyjmeme-li z mycí komůrky všechny sklíčka najednou, pouze zvyšujeme riziko vysušení jamky. Je-li vnitřní oblast jamky jakkoli vysušena, pár antigen-protilátka je narušen a objeví se vysoká fluorescence pozadí. Nejjistějším způsobem jak se tomu vyhnout je, že vždy manipulujeme pouze s jednou destičkou.
- Není-li barevný kroužek vymezující jamku řádně osušený, konjugát se dostane přes něj a znehodnotí jej.
- Konjugát by měl překrývat celou jamku. V opačném případě budou některé oblasti bez fluorescence.
- Ampule s konjugátem BioSystems je kalibrována na přidání 35-40 µL konjugátu. Má-li toto množství bezpečně překrýt jamku, pohybujte ampulí v mírném kruhu, když kapka visí na špičce.

10. Ihned po přidání konjugátu umístěte sklíčka na 30 minut do vlhké komůrky.

- Poznámky viz bod 6.
- Protože fluoresceinový konjugát je citlivý na světlo, vyhněte se přímému slunečnímu světlu, nebo práci za přímého světla. Ze všech možností je nejvhodnější tmavá vlhká komůrka.

11. Přebytek konjugátu odstraňte přidáním několika kapek pufru.

- Poznámky viz bod 7.

12. Sklíčka omývejte dvakrát, vždy nejméně 5 minut.

- Poznámky viz bod 8.

13. Mírně osušte podložní sklo, abyste odstranili přebytek pufru.

- Pracujte vždy pouze s jednou destičkou! Vyjmeme-li z mycí komůrky všechny destičky najednou, pouze zvyšujete riziko vysušení jamky. Je-li vnitřní oblast jamky jakkoli vysušena, pár antigen-protilátka je narušen a objeví se vysoká fluorescence pozadí. Nejjistějším způsobem jak se tomu vyhnout je, že vždy manipulujete pouze s jednou destičkou.

14. Jak správně osušovat sklíčko pomocí vysoušecího- blotinového papíru.

Pokud je třeba osušit okolí jamek po promytí skel použijte tzv. blotinový – osušovací papír, který přitisknete na povrch sklíčka. Pro dokonalé osušení okolí jamek je třeba použít ještě druhý papír a opakovat činnost. Pokud chcete rovnoměrně blotinový papír přitisknout na sklíčko použijte na jeho přitlačení např. čisté podložní sklíčko. Použitý papír lze po usušení použít několikrát. Pokud neprovedete řádné osušení okolí jamek pak hydrofobní část skla (část oddělující jamku od ostatního prostoru) neplní řádně svou funkci a může docházet ke slévání konjugátu.

14. Dejte na podložní sklo montovací médium a zakryjte ji krycím sklíčkem.

- Nepřidávejte příliš montovacího média. Postačí pár kapek na destičku. Přebytek montovacího média vede při pozorování mikroskopem k vytvoření filmového efektu, který snižuje kontrast mezi fluorescentními a nefluorescentními oblastmi.
- Vyhněte se bublinám. V oblastech s bublinami tkáň zakrátko vyschne a způsobí vysokou fluorescenci pozadí.
- Přebytek montovacího média odstraňte tím, že destičku vysušíte na principu vztlakovosti papírovým ubrouskem.
- Nikdy se nesnažte odstranit nebo upravit polohu krycí sklíčka, které již bylo připojeno k destičce: síla, kterou musíte vynaložit, by mohla poškodit, nebo oddělit tkáň. Potřebujete-li krycí sklíčko odstranit, vložte destičku do mycí komůrky a několik sekund počkejte. Vnitřní a vnější tlaky se vyrovnají a krycí sklíčko sklouzne z podložního skla.

15. Podložní sklo prohlédněte pod fluorescenčním mikroskopem.

- Standardní zvětšení je 250× pro tkáň a 400× pro buňky.
- Nemůžete-li vzorek prohlédnout okamžitě, měli byste podložní sklo s preparátem skladovat v temnu při teplotě 2-8 °C do doby, než bude zkoumání možné. Přílišný odklad odečtu v každém případě snižuje fluorescenční intenzitu.
- Fluorescenční mikroskop by měl být umístěn v temném prostoru, mimo dosah světelné interference. Ne všechny fluorescenční mikroskopy vám poskytnou jasný a ostrý signál a některé z nich jsou citlivější na světlo okolního prostředí.

POZNÁMKY na závěr:

Fluorescence pozadí je nejčastější známkou toho, že něco není v pořádku. Je-li tento jev častý, zkontrolujte svůj postup.

Vysušení tkáňe po zahájení techniky vždy vede k fluorescenci pozadí.

Promytí by mělo být prováděno s čistým, čerstvým pufrem. Se „špinavým“ pufrem nic neumyjete.

Každé podložní sklo s preparátem společnosti BioSystems je označeno číslem šarže a sériovým číslem. Obě čísla jsou důležitá při zpětném sledování sklíčka v případě jakéhokoli problému s destičkou. Nevyhazujte obal podložního sklíčka do odpadu, dokud není technika bez problému skončena.

Interpretace pod mikroskopem není snadnou záležitostí. Jakákoli interference může vést k chybné interpretaci sklíčka.

Klinické nálezy přinášejí denně nové obrazy (zobrazení). Užitečným opatřením je uchovávání alikvotů těch vzorků, které vykazují neobvyklé obrazy, pro budoucí srovnání.

Výše uvedený materiál byl zpracován dle firemních poznatků a doporučení společnosti BioSystems.

Za společnost JK-Trading s.r.o. výhradního distributora společnosti BioSystems
Ing. Arno Kryl, tel 257 220 760, GSM 00420-777 929 604

© Zpracováno 20/4/2017