

Használati utasítás a BIOGNOST® ANTIGEN meghatározáshoz



**DFA:** ANTIGÉN kimutatás DIREKT IMMUNOFLUORESCENS TECHNIKÁ-val: Az egy-lépéses technika alapját FITC-el jelölt mono-, illetve poliklonális antitestek képezik.

**IFA:** ANTIGÉN kimutatás INDIREKT IMMUNOFLUORESCENS TECHNIKÁ-val: A két-lépéses technika alapját elsődleges mono-, illetve poliklonális antitestek és FITC-el jelölt másodlagos antitestek képezik.

#### Felhasználási terület

A Biognost® Ag DFA direkt, a Biognost® Ag IFA indirekt immunfluoreszcens assay a patogének minőségi meghatározására közvetlenül a beteg anyagból, vagy izolációt követően. A Biognost® Ag assay-t in vitro diagnosztikai használatra tervezték.

#### A MEGHATÁROZÁS ELVE

A teszt klasszikus immunfluoreszcens metodikán alapul. A beteg mintát üveg lemezre kell helyezni, majd megfelelő fixálásnak kell alávetni (lásd "Minta gyűjtése és Előkészítése"). Aztán a megfelelő antigénre specifikus antitest reagenst kell felvinni, vagy a fluoreszcenccel jelölt antitestet (DFA) vagy a jelöletlen antiszérum/elsődleges antitestet (IFA), és inkubáljuk. Pozitív minta esetén, a mono- vagy poliklonális antitestek kötődni fognak a specifikus mikrobiológiai target antigénekhez. Az antitest feleslege ezt követően a lemezeknek a rendelkezésre álló mosó pufferben történő öblítésével távolítható el.

DFA-nál a lemezeket fedőlemezzel kell lefedni. Az IFA-nál a második inkubációs lépés alatt, a kötött elsődleges antitestekhez FITC-el jelölt másodlagos antitesteket kötünk (konjugátum). A konjugátum feleslege újbóli mosással távolítható el. Aztán a lemezeket fedőlemezzel fedjük.

Antigén/konjugátum (DFA) vagy antigén/elsődleges antitest/konjugátum (IFA) komplexek alakulnak ki, melyek fluoreszcens mikroszkóppal 400-500-szoros felbontással láthatóak. A konjugát/elsődleges antitest szenzitivitását és specificitását ellenőrizni kell megfelelő antiszérum/konjugátum kontroll lemezekkel.

Kerülje a mosási eljárás alatt a lemezek mozgását! Máskülönbön immobilizált antigének károsodhatnak vagy kimosódhatnak.

#### AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

A Biognost® Immunfluoreszcens assay-k a patogénekre specifikus mikrobiológiai antigének kvalitatív meghatározása akár közvetlenül beteg mintából, vagy mikrobiológiai izolátumból. Patogén infekció diagnosztikájában a pozitív eredmény megállapításának feltétele, hogy egy lemezen csak egy beteg mintát vizsgáljanak.

Ha ugyanazon a lemezen (vagy különböző, de ugyanazon festőkádban egy időben feldolgozott lemezekben) különböző betegmintákból egynél több minta ad pozitív eredményt, a pozitív teszt eredményeket újra kell vizsgálni. A különböző felcseppentési helyekre felvitt különböző minták között kereszt-kontamináció jöhet létre a mosási eljárás alatt. Az ilyen esetekben valamennyi pozitív eredményt egyedileg meg kell erősíteni (egy mintához egy lemezt, vagy egy mintához egy festést használnon).

Azokban, más antigén módszerhez hasonlóan a negatív eredmény soha nem zárja ki biztonsággal a beteg patogénnel való fertőzését. Mindig meg van az eshetősége annak, hogy a specifikus infekciós ágens nincs jelen az analízishez gyűjtött mintában, vagy a teszthez használt mintarészben. Ezért, ha negatív eredményt kap azokban az esetekben, ahol a specifikus infekció gyanúja erős, a tesztet inkább ismétlje meg egy újabb mintából. Az eredményt meg lehet erősíteni szerológiai módszerrel vagy kultúrából.

#### BIOGNOST® REAGENSEK AZ ANTIGÉN MEGHATÁROZÁSHOZ

**DFA:** Patogén specifikus FITC-el jelölt konjugátum (poli- vagy monoklonális, felhasználásra kész vagy koncentrált), kontroll lemezek, PBS, mounting medium, fedőlemez; az aktuális Bios Pricelist alapján.

**IFA:** Patogén specifikus antitestek (poli- vagy monoklonális, felhasználásra kész vagy koncentrált), FITC-el jelölt másodlagos antitest, kontroll (antigénnel bevont kontroll lemezek vagy üres lemezek pozitív és negatív szuszpenziókkal), PBS, mounting medium, fedőlemez; az aktuális Bios Pricelist alapján.

#### SZÜKSÉGES ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK

1-1000 µl-es precíziós pipetták és pipetta hegyek

Vortex

500 ml vagy 1000 ml-es lombik a foszfát puffer oldat készítéséhez

Desztillált vagy deionizált víz

Nedves inkubációs kamra

Inkubátor (37°C) (tetszőleges)

Nagy mosó kádak

Mosó üveg a puffernek

Óra

Sötétlátóterés mikroszkóp 450-490 nm gerjesztett filterrel és 560-590 nm emisszióval (a jobb szenzitivitás érdekében a beeső gerjesztést előnyben részesítik a transzmissziós gerjesztéssel szemben). Ne használjon immerziós olajat!

#### TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

Valamennyi antitest oldatot (elsődleges antitestek és konjugátumok) valamint a kontroll lemezeket a címkén előírtak szerint szobahőn tárolja. Az antigénnel bevont lemezeket (kontroll lemezek) a kiszáradás megakadályozása végett megfelelően lezárt alumínium tasakokban tartsa. Valamennyi komponens a címkén jelzett lejárati ideig őrzi meg stabilitását, ha az ajánlott tárolási követeléseket szigorúan követi. A lejáratot követően a komponenseket ne használja!

A légmentesen zárt foszfát-só puffer por keveréket, valamint a mounting medium-t és a fedőlemezeket határozatlan ideig tárolhatja szobahőn vagy az alatt. Ezen tételek termék címkéjén ennek ellenére lejárati dátum van feltüntetve. Ez csak megszokás, semmilyen célt nem szolgál.

A PBS mosó puffer (pH 7.5) a használat napján frissen készíthető, tartósítószeret nem tartalmaz. Amennyiben a maradék puffer oldatot megfelelően, 5-10°C-on tárolja, a későbbiekben is felhasználhatja. Öntse ki a PBS puffert, ha zavarossá válik, elszíneződik, precipitátumok jelennek meg benne, vagy a pH-ja megváltozik.

#### BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK

1. Az összes beteg mintát, melyet az antigén meghatározásokban használ, potenciálisan fertőzöttnek kell tekinteni és ennek megfelelően kell kezelni.
2. Az antitest oldatok (elsődleges antitestek és konjugátumok) és a mounting medium 0.09% nátrium-azidot vagy egyéb tartósítószer tartalmaz. Valamennyi tartósító mérgező. Az azid tartalmú reagensek ne kerüljenek kapcsolatba réz vagy ólom tartalmú tárgyakkal, mert ez robbanó fémazidok keletkezéséhez vezethet.
3. A címkén jelzettek szerint, néhány konjugátum Evans-kék festéket tartalmaz. Az Evans-kék karcinogén (a Swiss mérgeztáblázat alapján 1. osztályú mérge). Habár a festék koncentrációja nagyon alacsony (maximum 0.2 mg/ml), a felhasználóknak vigyázniuk kell, hogy ezek a konjugátumok ne kerüljenek a bőrre!
4. Az aktuális Good Laboratory Practice (GLP irányelvek) szabályait mindig követni kell.
5. Az anyagokat és reageneket rendeltetészerűen szabad használni az alkalmazott jogi szabályoknak megfelelően.

#### MINTAGYŰJTÉS ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A mintagyűjtés, stabilizálás, szállítás és előkészítés nagymértékben meghatározzák a teszt eredményeit. A Biognost® antigen meghatározás előtt a laboratóriumoknak meg kell határozni az antigén gyűjtésére és kezelésére szolgáló eljárásokat (klinikusok és patológusok együttműködésével).

Gasztrointesztinalis fertőzésekben a keresett mikrobiológiai antigént legjobb székletmintából meghatározni, mely 10% formalinnal konzerválható. (Tartósításra polivinil alkohol vagy thimerosal-iodin-formaldehid nem alkalmas.)

A légzőszervi infekciókban a specifikus antigének meghatározása számos mintából lehetséges a következő eljárások egyikével vett mintából: bronchoalveolaris lavage, bronchoszkópikus biopszia, transztracheális aspiráció, köpet, torok vagy nasopharyngiális tampon, pleurális punkció, autopsy és kultúra (kultúra megerősítő teszt).

**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

Amennyiben köpetet használ, a mintákat dithio-threitollal vagy N-acetil ciszteinnel elő kell kezelni, a minták viszkozitásának csökkentése végett.

A HSV könnyen detektálható vesiculáris folyadékból vagy hólyag kaparékból.

Az intracelluláris mikrobiológiai antigének megbízható detektálása csak úgy lehetséges, ha a gyűjtött minta megfelelő számú fertőzött sejtet tartalmaz. Azokban az esetekben, ahol párhuzamos analízis, vagy a teszt eredményeinek megerősítése sejtkultúrával történik, a mikrobiológiai infekciók megőrzése végett a betegtől történő mintavételt követően, a mintát szállításhoz, közvetlenül egy arra alkalmas transzport médiumba kell helyezni.

#### **Fixálás/Inaktiválás:**

Minden beteghez különböző lemezt kell használni. Helyezzen megfelelően előkezelt mintát a teszthez használt lemezre és hagyja szobahőmérsékleten, levegőn teljesen megszáradni (15-30 perc, függ a szubsztrát rétegvastagságától). Vigyázat: azok a minták, amelyek nem lettek alaposan megszáritva, hajlamosak a mosási lépés alatt a lemezről leválni! A következő lépésben a lemez melegítésnek - és/vagy acetone- és/vagy formalin -fixálásnak (egyszeres-, kétszeres- vagy háromszoros fixálás) van kitéve. Amikor valamennyi oldószer elpárolog a lemezről, a mintákat antigén-specifikus antitestekkel inkubálja, ez indirekt immunfluoreszcens technika (IFA) esetén jelöletlen elsődleges antitest, vagy a direkt technika (DFA) esetén fluorezceninnel jelölt antitest.

Az eukarióta minták gyűjtéséről és kezeléséről olvassa el az aktuális irodalmat.

#### **MINŐSÉGELLENŐRZÉS ÉS HIBAELHÁRÍTÁS**

Az antiszérum és/vagy konjugátum pozitív és negatív kontroll lemezeit mindegyik indításhoz tartalmaznia kell. Ha a kontroll lemezek nem a várt eredményeket mutatják, a teszt érvénytelen és meg kell ismételni.

Amennyiben a kontroll lemezek nem a megfelelő eredményeket mutatják, ellenőrizni kell a következőket: A tesztben használt komponensek nem a Bios-tól származnak (pl. fedőlemezek, mounting medium stb. más szállítótól való); a puffer frissen készített-e; van-e valamilyen funkcionális rendellenessége a fluorezcens mikroszkópnak, úgymint az objektív lencse olajjal való bekenése, gyenge optikai beállítás, gyenge szűrő fény; a lemezeket és reagenseket helyesen lettek-e tárolva vagy a felhasznált komponensek már lejártak; az inkubációs kamra elegendően nedves volt-e (a feldolgozás alatt a lemezek applikációs helyeit nem szabad kiszáradni hagyni), a lemezek filctollal meg lettek-e jelölve, stb. Tilos a reagensek megfelelő hőmérsékletének elérését melegtűréssel felgyorsítani.

#### **A MEGHATÁROZÁS MENETE**

Biognost® konjugátumok a direkt immunfluoreszcens technikához rendszerint felhasználásra kész állapotban kerülnek forgalomba, ha nem a hígítás módja a címkén olvasható. Először oldott, a felhasználásra kész konjugátumok a tesztindításhoz közvetlenül használhatók. Néhány konjugátum koncentrált oldat formájában kapható és a címkén jelzettek szerint hígítani kell. Ha a címkén nem adott a hígítási mód, a felhasználónak kell meghatározni a munkához a koncentrált konjugátum optimális hígítását (a címkén a konjugátum "konjugát koncentrátum"). Azonban a hígított konjugátum hosszabb időn keresztül nem stabil és így minden indításhoz frissen kell készíteni. Az indirekt immunfluoreszcens technikához a Biognost® elsődleges antitestek, valamint a másodlagos antitestek (konjugátumok) felhasználásra kész reagensek formájában kaphatók. Máskülönb a címkén leírtak szerint hígítható.

#### **I. Direkt Immunfluoreszcens Assay (DFA):**

1. Tegyen a teszthez használt lemezekre megfelelő mennyiségű (egy vagy több csepp) felhasználásra kész, vagy megfelelően hígított konjugátumot, így fixálja a beteg mintákat.
2. Inkubálja a lemezeket 30 percig szobahőn, vagy 37°C-on (intracelluláris organizmusok) nedves kamrában. Védje a lemezeket a direkt napsütéstől; tartsa távol a fűtőtestektől.
3. Vegye ki a lemezeket a kamrából, a folyadék feleslegét távolítsa el és óvatosan öblítse le a lemezeket foszfát-só pufferrel. (A cél nem a puffer közvetlen applikációs helyekre történő öntése!)
4. Merítse a lemezeket 2x 5 percre foszfát-só pufferbe; használjon nagy festő kádakat és cserélje a puffert a ciklusok között. Ne mozgassa a lemezeket a két mosás alatt.
5. Törölje szárazra a lemezeket az applikációs helyek körül szűrőpapírral. Ebben a szakaszban a szubsztrátot nem szabad kiszáradni hagyni. Ezért folytassa a 6. lépéssel.
6. Helyezzen mindegyik lemezre 2-3 csepp mounting medium-ot, a légbuborékok eltávolításával légmentesen fedje le a lemezeket fedőlemezzel. A túlfolyó mounting medium-ot törölje le pufferrel benedvesített papírtörülkövel, a lemezeknek a mikroszkóp tárgylapjához, vagy a lemez tároló doboz aljához történő ragadásának megakadályozása miatt. Fluorezcens mikroszkóppal értékelje a lemezeket. A legjobb eredményeket azonnali leolvasással kaphat. A lemezek két órán át tárolhatók sötétben és hűvös helyen és védeni kell őket a kiszáradástól.

#### **II. Indirekt Immunfluoreszcens Assay (IFA):**

1. Tegyen a teszthez használt lemezekre megfelelő mennyiségű (egy vagy több csepp) elsődleges antitestet, így fixálja a beteg mintákat.
2. Inkubálja a lemezeket 30 percig szobahőn, vagy 37°C-on (intracelluláris organizmusok) nedves kamrában. Védje a lemezeket a direkt napsütéstől; tartsa távol a fűtőtestektől.
3. Vegye ki a lemezeket a kamrából, a folyadék feleslegét távolítsa el és óvatosan öblítse le a lemezeket foszfát-só pufferrel. (A cél nem a puffer közvetlen applikációs helyekre történő öntése!)
4. Merítse a lemezeket 2x 5 percre foszfát-só pufferbe; használjon nagy festő kádakat és cserélje a puffert a ciklusok között. Ne mozgassa a lemezeket a két mosás alatt.
5. Törölje szárazra a lemezeket az applikációs helyek körül szűrőpapírral. Ebben a szakaszban a szubsztrátot nem szabad kiszáradni hagyni. Ezért folytassa a 6. lépéssel.
6. Tegye a megfelelő konjugátumot (FITC-el jelölt másodlagos antitestek) a lemezekre az 1. lépésben leírtak szerint.
7. Inkubálja a lemezeket 30 percig szobahőn, nedves kamrában. Védje a lemezeket a direkt napsütéstől; tartsa távol a fűtőtestektől.
8. Ismételd meg a 3-5 lépéseket, majd az I., 6.-nak megfelelően járjon el.

#### **ÉRTÉKELÉS**

A lemezeket sötétlátóterű fluorezcens mikroszkóp (filter tartomány: 450-490 nm) alatt 400-500-szoros felbontással nézze (általános nézet 100szoros nagyítás). Ahhoz, hogy elkerülje a lemezek szenzitivitásának elvesztését, ne időzzen egy látóteren hosszabb ideig, mint amit az értékelés feltétlenül megkíván. A legjobb eredmények elérése érdekében vizsgáljon át gyorsan több látóteret is.

A lemezeket elkészültük után a lehető leghamarabb értékelje mikroszkóp alatt. Ha nem lehetséges, az elkészült lemezeket sötét, hűvös helyen kell tárolni és védeni kell a kiszáradástól. Hosszú tárolás esetén – például, ha oktatási célra kívánja a lemezeket megőrizni – fedje le azokat tiszta körömlakkal és helyezzen rá fedőlemezt és -20 °C-on, vagy az alatt tárolja.

#### **Immunfluoreszcens festési mintázatok:**

A lemezek értékelésénél csak a karakterisztikus mikrobiológiai struktúrák festődését kell figyelembe venni.

##### **Pozitív:**

Specifikus, világos almazöld színű fluorezcenciát mutat. Általában az intenzitás foka 1+ (gyenge)-től, a 2+ (közepes), 3+ (erős) át 4+ (nagyon erős)-ig terjed.

A minta a vizsgált patogénre nézve pozitívnek tekintendő, ha a tipikus patogén struktúrák fluorezcenciája legalább 1+.

##### **Negatív:**

Ha a fluorezcens ráta kisebb, mint 1+, a minta negatívnek tekintendő. A sárga vagy sötét szürke fluorezcencia aspecifikus és nem kell figyelembe venni.

#### **Target antigének és target struktúrák:**

A Biognost® antitest reagensek specifikusan felismerik az antigén struktúrákat, amelyek karakterisztikája a vizsgált patogénre jellemzőek (baktériumok, CPE, stb.) Ha a fluorezcens mikroszkóp a patogén struktúrák tisztán látható, világos almazöld színű fluorezcenciáját mutatja, a vizsgált mintát pozitívnek kell tekinteni; már egyetlen fluorezcens antigén struktúra jelenléte elegendő bizonyíték a beteg vizsgált patogénnel történő infekciójára.

Valamennyi esetben az eredmények interpretációjánál figyelembe kell venni az általános klinikai kórképet, a mintagyűjtés körülményeit és egyéb laboratóriumi leleteket.

**IRODALMAK**

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