

## Gebrauchsinformation BIOGNOST® ANTIGEN Nachweis



**DFT:** ANTIGENNACHWEIS mit DIREKTER IMMUNFLUORESCENZ: Einschritttechnik mit FITC-markierten Antikörpern  
**IFT:** ANTIGENNACHWEIS mit INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ: Zweischritttechnik mit Erst- u. FITC-markierten Zweitantikörpern

### BESTIMMUNGSGEMÄßER GEBRAUCH

Der Biognost® Ag DFT ist ein direkter, der Biognost® Ag IFT ein indirekter Immunfluoreszenztest für die qualitative Bestimmung von Krankheitserregern direkt aus dem Patientenmaterial oder nach der Isolierung. Der Biognost® Ag Nachweis ist zum Einsatz in der in vitro Diagnostik bestimmt.

### TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der klassischen Methode der Immunfluoreszenz. Das Patientenmaterial wird nach der Fixierung auf einem Glasobjektträger (siehe Punkt UNTERSUCHUNGSMATERIAL) mit Konjugat bzw. Antiserum/Erstantikörper inkubiert. Dabei binden die antigenspezifischen mono- bzw. polyklonalen Antikörper an die in positiven Patientenproben vorhandenen spezifischen Pathogene. Überschüssige Antikörper werden durch einen Waschschrift entfernt. Beim DFT wird der Objektträger danach eingedeckt. Beim IFT wird in einem zweiten Schritt mit dem FITC-markierten Zweitantikörper (Konjugat) inkubiert und erneut gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Danach wird der Objektträger eingedeckt. Der Komplex Antigen/Konjugat (DFT) oder Antigen/Erstantikörper/Konjugat (IFT) ist dann unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-500facher Vergrößerung sichtbar.

### GRENZEN DER METHODE

Die Biognost® Immunfluoreszenztests zum Antigennachweis ermöglichen den spezifischen, qualitativen Nachweis von Krankheitserregern direkt aus dem Patientenmaterial oder nach der Isolierung. Positive Testergebnisse stellen einen Beweis für eine Infektion mit dem jeweiligen Erreger dar. Dies gilt allerdings nur, falls nur eine Patientenprobe pro Objektträger angesetzt wird. Bei gleichzeitiger Untersuchung von Materialien verschiedener Patienten auf ein und demselben Objektträger (oder auf mehreren Objektträgern, die in den gleichen Färbetrögen gewaschen werden), ist bei mehr als einem positiven Ergebnis Vorsicht angezeigt. Es kann nicht 100%ig ausgeschlossen werden, dass ein Teil des Untersuchungsmaterials beim Ansetzen des Nachweises während des Waschens von einer Auftragsstelle zur anderen gespült wurde. In solchen Fällen müssen beide bzw. alle positiven Ergebnisse noch einmal einzeln überprüft werden. Sicherheitshalber sollte stets nur ein Patient pro Objektträger untersucht und jeder Objektträger einzeln in einem Waschtrog gewaschen werden. Wie bei allen Antigennachweisen schließen negative Testergebnisse eine Infektion nicht aus. So besteht immer die Möglichkeit, dass das entnommene Patientenmaterial oder der Anteil, der daraus zum Ansetzen des Tests entnommen wurde, keine spezifischen Krankheitserreger enthalten. Aus diesem Grund ist es ratsam, bei negativen Ergebnissen und konkretem Verdacht den Test (am besten auch mit einer frischen Probe) zu wiederholen bzw. - je nach Erreger - durch serologische Methoden oder Anzucht in Kultur zu überprüfen/bestätigen.

### BIOGNOST® REAGENZIEN FÜR DEN ANTIGENNACHWEIS

**DFT:** Pathogenspezifisches FITC-markiertes Konjugat, gebrauchsfertig; Kontrollobjektträger; PBS; Einschlussmedium; Deckgläser.  
**IFT:** Pathogenspezifischer Antikörper, gebrauchsfertig; FITC-markierter zweiter Antikörper, gebrauchsfertig; Kontrollen (Antigen beschichtete Kontrollobjektträger oder leere Objektträger mit positiver und negativer Kontrolle); PBS; Einschlussmedium; Deckgläser.

### ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Pipetten (Bereich 1-1000 µl)

Vortex Mischer

Messkolben (500 ml bzw. 1000 ml) zur Herstellung des Phosphatpuffers

Destilliertes oder demineralisiertes Wasser

Feuchte Kammer

ggf. Brutschrank (37°C)

Färbetröge (möglichst groß)

Spritzflasche für PBS Puffer

Kurzzeitmesser

Dunkelfeld Fluoreszenzmikroskop mit trockenem Objektiv (ohne Immersionsöl zu benutzen) mit Filtern, für eine Anregungswellenlänge von 450-490 nm und eine Emission von 560-590 nm. Für eine höhere Empfindlichkeit ist ein Auflichtmikroskop einem Durchlichtmikroskop vorzuziehen.

### LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Antikörperlösungen (Erstantikörper und Konjugate) und Kontrollobjektträger müssen bei der jeweils auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Die Objektträger sind weiterhin wegen der Austrocknungs- und Denaturierungsgefahr im geschlossenen Aluminiumbeutel, also luftdicht verschweißt, zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Reagenzien **ungeöffnet** bis zum Verfalldatum haltbar. Nach Ablauf des Verfalldatums sind sie nicht mehr zu verwenden.

Nach Anbruch müssen die flüssigen Reagenzien wieder gut verschlossen und bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Sie sind nach der Erstöffnung schnellstmöglich zu verbrauchen. Das Verfalldatum einer Charge garantiert im Fall geöffneter flüssiger Reagenzien nicht „die Haltbarkeit bei Wiederverwendung“.

Die Substratobjektträger können nicht wiederverwendet werden. Sie müssen nach der Öffnung des Aluminiumbeutels komplett verbraucht werden.

Die PBS Puffer Festsubstanz ist bei Raumtemperatur und darunter **ungeöffnet**, d.h. im Aluminiumbeutel luftdicht verschweißt, unbegrenzt haltbar. Einschlussmedium, Saugpapierschablonen und Deckgläser sind bei Raumtemperaturlagerung oder niedrigerer Temperatur ebenfalls unbegrenzt haltbar. Das Verfalldatum auf dem Etikett dient beim PBS Puffer, Einschlussmedium sowie bei den Saugpapierschablonen und Deckgläsern nur der Organisation der Lagerhaltung. Angesetzte PBS Pufferlösung (pH 7,5) ist am selben Tag zu verbrauchen, da sie kein Konservierungsmittel enthält. Bei Verwendung am nächsten Tag muss sie zwischenzeitlich bei 5-10°C

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](mailto:bios@bios-world.com), Biosite® [www.bios-world.com](http://www.bios-world.com)

verschlossen gelagert werden. PBS Pufferlösungen mit Schlieren-, Flocken- oder Trübungsbildung bzw. Farb- oder pH-Wert-Änderung sind zu verwerfen.

Bitte informieren Sie sich auch auf unserer Biosite®: [www.bios-world.com/Aktuelles/Wichtig](http://www.bios-world.com/Aktuelles/Wichtig) zu wissen: Laufzeiten von IVD gelten nur bedingt.

### SICHERHEITSHINWEISE

1. Alle Reagenzien sind ausschließlich für die in vitro Diagnostik bestimmt.
2. Alle zu untersuchenden Patientenmaterialien sind potentiell infektiös und müssen mit der entsprechenden Vorsicht behandelt werden.
3. Die Antikörperlösungen (Erstantikörper und Konjugate) und das Einschlussmedium enthalten 0,09% Natriumazid oder andere mikrobizide Substanzen. Natriumazid und alle anderen konservierenden Substanzen sind giftig. Das Verschlucken und Haut- bzw. Schleimhautkontakt ist zu vermeiden. Natriumazidhaltige Reagenzien dürfen nicht mit kupfer- oder bleihaltigen Gegenständen in Verbindung gebracht werden (Bildung explosiver Salze).
4. Einige Konjugate enthalten Evans blue (auf dem Etikett angegeben). Evans blue könnte karzinogen sein (der Schweizer Giftklasse 1\* zugeordnet). Vermeiden Sie deshalb das Verschlucken sowie den Hautkontakt mit Evans blue haltigen Lösungen.
5. Sicherheitsbestimmungen der Berufsgenossenschaft und des jeweiligen Institutes (Labors) bezüglich biogefährdenden, giftigen und reizenden Stoffen sind strikt zu beachten (siehe Aushänge, Laborjournal, Sicherheitsbelehrung sowie die aus Zertifizierung bzw. Akkreditierung resultierenden Arbeitsvorschriften).
6. Die aktuellen Regeln der guten Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP) sollten immer beachtet werden.
7. Nach der Testdurchführung sind alle im Test benutzten Reagenzien und Seren entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen und der Arbeitsplatz zu desinfizieren.

### UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die Probennahme, die Stabilisierung der Probe, der Probentransport, die Aufarbeitung der Probe für die Laboruntersuchung etc. entscheiden wesentlich über die Aussagekraft des Testergebnisses. Vor dem Einsatz unserer Reagenzien sollte das Anwenderlabor deshalb den Antigen-Nachweis Arbeitsplatz etabliert haben. Für eine parallele Untersuchung bzw. Ergebnisbestätigung durch Zellkulturanzucht ist die Probe stets sofort in einem geeigneten Transportmedium aufzunehmen.

Der Nachweis gastrointestinaler Erreger sollte aus Stuhlproben erfolgen, die z.B. mit 10% Formalin konserviert sein können. (Polyvinylalkohol und Merthiolat-Jod-Formaldehyd sind hier als Konservierungsmittel dagegen nicht geeignet).

Zum Nachweis respiratorischer Erreger eignen sich grundsätzlich broncho-alveoläres Lavagematerial, bronchoskopisch gewonnenes Biopsiematerial, transtracheales Aspirat, (induziertes) Sputum, Rachen- und Nasopharyngalabstrichmaterial, Pleurapunktat, Autopsie- und auch Kulturmateriale (Kulturbestätigungstest).

Bei der Untersuchung von Sputum kann eine Verflüssigung der Proben durch Vorinkubation mit Dithiothreitol oder N-Acetylcystein sinnvoll sein.

HSV lässt sich gut aus Bläschenflüssigkeit oder Bläschengrundabstrichen nachweisen.

Wichtige Voraussetzung für den Nachweis intrazellulärer Erreger ist eine ausreichende Anzahl (antigentragender) Zellen im Probenmaterial.

### Fixierung/Inaktivierung:

Auf jeden Objektträger wird aufbereitetes Material von jeweils nur einem Patienten aufgetragen und bei Raumtemperatur vollständig luftgetrocknet (15-30 min, je nach Schichtdicke). Achtung: Nicht vollständig getrocknete Proben lösen sich beim Waschen leicht wieder ab! Anschließend werden die Objektträger einem Hitze- und/oder Aceton- und/oder Formalinfixierungsschritt unterworfen (Ein-, Zwei- oder Dreifachfixierung). Nach dem Verdunsten der Lösungsmittelreste ist das Präparat fertig für die Inkubation mit dem antigenspezifischen Erstantikörper bzw. Konjugat.

Für die Probenentnahme und Bearbeitung bei Eukaryonten verweisen wir auf die entsprechende aktuelle Fachliteratur.

### QUALITÄTSKONTROLLE UND FEHLERSUCHE

Ein Kontrollobjektträger für die positive und negative Konjugat- bzw. Antiserum-Kontrolle sollte bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Ergibt der Kontrollobjektträger nicht die erwarteten Ergebnisse, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden. Liefern die mitgeführten Kontrollobjektträger im Anwenderlabor keine eindeutigen Ergebnisse, so sollte überprüft werden, ob ausschließlich Biognost® Testkomponenten im Testansatz verwendet wurden oder z.B. andere Deckgläser, anderes Einschlussmedium, nicht frisch angesetzter Biognost® Puffer. Weiterhin muss überprüft werden, ob das benutzte Fluoreszenzmikroskop einwandfrei funktioniert; mögliche Fehlerquellen sind ölverschmutzte Objektive, Dejustierung oder eine zu schwache Lampe. Desweiteren ist zu prüfen, ob die Reagenzien richtig gelagert wurden bzw. bereits verfallen sind, ob die im Testansatz verwendete feuchte Kammer feucht genug ist, ob der Objektträger mit einem Filzstift beschriftet wurde (bitte nur harten Bleistift benutzen) etc. Auch sollten die Reagenzien auf keinen Fall durch Erhitzen auf Raumtemperatur gebracht werden.

Um eine Beschädigung oder das Ablösen des fixierten Antigens zu vermeiden, darf während des Waschens nicht gerührt werden.

Eine Gewährleistung durch die Firma Bios® ist nur dann gegeben, wenn die Angaben der Gebrauchsinformation exakt eingehalten, im Test nachweislich nur Bios Produkte eingesetzt werden und der Test nur durch Fachpersonal durchgeführt wird.

### TESTDURCHFÜHRUNG

Die Biognost® Testreagenzien sind gebrauchsfertig, sobald sie sich auf Raumtemperatur erwärmt haben (ca. 5 min). Die Kontrollen und das Konjugat sind also unverdünnt zu benutzen.

#### I. Testdurchführung beim direkten Immunfluoreszenztest (DFT):

1. Einen bis mehrere Tropfen des gebrauchsfertigen Konjugats auf den Objektträger tropfen, so dass das fixierte Patientenmaterial vollständig bedeckt ist.
2. Objektträger lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C (intrazelluläre Keime) in feuchter Kammer inkubieren. Dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.
3. Objektträger feuchter Kammer entnehmen, Flüssigkeitsüberschuss mit PBS vorsichtig abspülen (Strahl aus Spritzflasche dabei keinesfalls direkt auf die Auftragstelle richten!).

**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](mailto:bios@bios-world.com), Biosite® [www.bios-world.com](http://www.bios-world.com)

4. 2x 5 min in PBS Puffer waschen (nach 1x 5 min Wechsel in neuen Puffer); möglichst große Färbetröge benutzen und den (die) Objektträger im PBS Puffer nicht bewegen bzw. nicht rühren. Jeder Objektträger kommt jeweils in einen eigenen Waschtrog!
5. Objektträger um die Auftragsstelle herum mit Filterpapier trocknen, aber Substrat dabei nicht trocken werden lassen und deshalb sofort anschließend
6. 2-3 kleine Tropfen Einschlussmedium auf dem Objektträger verteilen, Präparat luftblasenfrei mit Deckglas versehen und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Bei dunkler und kühler Aufbewahrung kann ausnahmsweise innerhalb der folgenden zwei Stunden ausgewertet werden. Übergelaufenes Einschlussmedium vorsichtig mit einem mit PBS angefeuchteten Papiertuch entfernen, um ein Ankleben am Mikroskoptisch bzw. im Präparatebehältnis zu vermeiden.

## II. Testdurchführung beim indirekten Immunfluoreszenztest (IFT):

1. Einen bis mehrere Tropfen der gebrauchsfertigen Erstantikörperlösung auf den Objektträger tropfen, so dass das fixierte Patientenmaterial vollständig bedeckt ist.
2. Objektträger 30 min bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C (intrazelluläre Keime) in feuchter Kammer inkubieren. Dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.
3. Objektträger feuchter Kammer entnehmen, Flüssigkeitsüberschuss mit PBS vorsichtig abspülen (Strahl aus Spritzflasche dabei keinesfalls direkt auf die Auftragstelle richten!).
4. 2x 5 min in PBS Puffer waschen (nach 1x 5 min Wechsel in neuen Puffer); möglichst große Färbetröge benutzen und den (die) Objektträger im PBS Puffer nicht bewegen bzw. nicht rühren. Jeder Objektträger kommt jeweils in einen eigenen Waschtrog!
5. Objektträger um die Auftragsstelle herum mit Filterpapier trocknen, aber Substrat dabei nicht trocken werden lassen und deshalb sofort anschließend
6. das entsprechende gebrauchsfertige Konjugat (FITC-markierter Zweitantikörper) wie unter 1 beschrieben auf den Objektträger tropfen.
7. Objektträger lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.
8. Objektträger feuchter Kammer entnehmen, Flüssigkeitsüberschuss mit PBS vorsichtig abspülen (Strahl aus Spritzflasche dabei keinesfalls direkt auf die Auftragstelle richten!).
9. 2x 5 min in PBS Puffer waschen (nach 1x 5 min Wechsel in neuen Puffer); möglichst große Färbetröge benutzen und den (die) Objektträger im PBS Puffer nicht bewegen bzw. nicht rühren. Jeder Objektträger kommt jeweils in einen eigenen Waschtrog!
10. Objektträger um die Auftragsstelle herum mit Filterpapier trocknen, aber Substrat dabei nicht trocken werden lassen und deshalb sofort anschließend
11. 2-3 kleine Tropfen Einschlussmedium auf dem Objektträger verteilen, Präparat luftblasenfrei mit Deckglas versehen und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Bei dunkler und kühler Aufbewahrung kann ausnahmsweise innerhalb der folgenden zwei Stunden ausgewertet werden. Übergelaufenes Einschlussmedium vorsichtig mit einem mit PBS angefeuchteten Papiertuch entfernen, um ein Ankleben am Mikroskoptisch bzw. im Präparatebehältnis zu vermeiden.

## AUSWERTUNG

Die Präparate werden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-500fachen Vergrößerung beurteilt (Filterbereich 450-490 nm). Nicht zu lange ein und dasselbe Gesichtsfeld mustern, sondern in rascher Folge möglichst viele Gesichtsfelder auswerten, um das Ausbleichen des Präparats zu vermeiden. Ein Testansatz kann nur dann bewertet werden, wenn die mitgeführten Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigen. Die besten Testergebnisse werden erhalten, wenn die Präparate sofort nach der Testdurchführung abgelesen werden. Wenn das nicht möglich ist, müssen die Präparate kühl, dunkel und vor Austrocknung geschützt gelagert werden.

### Fluoreszenzmuster:

Zur Auswertung dürfen nur Anfärbungen der charakteristischen Erregerstrukturen beurteilt werden.

### Positiv:

Die spezifische Fluoreszenz ist eine helle apfelgrüne Farbe mit unterschiedlicher Intensität: von 1+ schwach; über 2+ mäßig; 3+ stark bis 4+ brilliant.

### Negativ:

Fluoreszenzen mit geringerer Intensität als 1+ werden als negativ beurteilt. Gelbliche oder dunkelgrüne Fluoreszenzen sind unspezifisch und dürfen nicht berücksichtigt werden.

### Zielantigen oder Zielstruktur:

Werden unter dem Fluoreszenzmikroskop eine oder mehrere charakteristische Antigenstrukturen (Bakterien, CPE, etc.) beobachtet, die eine deutliche Fluoreszenz ( $\geq 1+$ ) zeigen, wird die Probe als positiv bewertet und kann als beweisend für eine Infektion mit dem entsprechenden Erreger angesehen werden.

## LITERATUR

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