

**Οδηγίες χρήσης BIOGNOST® Δοκιμασία Αντιγόνου****CE**

**DFA:** ανίχνευση αντιγόνων με άμεσο ανοσοφθορισμό **ΤΕΧΝΙΚΗ:** Η τεχνική του ενός βήματος βασίζεται σε σημειωμένα με FITC μονό/ ή πολυκλώνα αντισώματα.  
**IFA:** Ανίχνευση αντιγόνων με έμμεσο ανοσοφθορισμό **ΤΕΧΝΙΚΗ:** Η τεχνική δύο βημάτων με βάση μονό/ ή πολυκλωνικά πρωτογενή αντισώματα και FITC-επισημασμένο δεύτερο αντισώματα

**ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ**

Η Biognost® Ag DFA είναι άμεση ανίχνευση με ανοσοφθορισμό. Η Biognost® Ag IFA είναι μια έμμεση δοκιμασία ανοσοφθορισμού για τον ποιοτικό προσδιορισμό των παθογόνων απευθείας από υλικό ασθενή ή μετά την απομόνωση αυτού. Η δοκιμασία Biognost® Ag προορίζεται για χρήση στην in vitro διαγνωστική.

**ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ**

Το τεστ βασίζεται στην κλασική μέθοδο ανοσοφθορισμού. Το δείγμα του ασθενή πρώτα τοποθετείται σε ένα γυάλινο πλακίδιο και υποβάλλεται σε κατάλληλη διαδικασία στερέωσης (βλέπε ενότητα "Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία»). Στη συνέχεια καλύπτεται με ένα αντιδραστήριο αντισώματος της κατάλληλης ειδικότητας αντιγόνου, είτε ένα φλουορεσκεινή συζευγμένο αντίσωμα (DFA) ή ένα μη επισημασμένο αντιγόνο / πρωτογενές αντίσωμα (IFA), και επωάζονται. Σε περίπτωση θετικού δείγματος, τα μονό/ ή πολυκλώνα αντισώματα θα συνδέονται με συγκεκριμένα μικροβιακά αντιγόνα στόχους. Η περίσσεια του αντισώματος στη συνέχεια απομακρύνεται με έκπλυση του slide με το παρεχόμενο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Μία καλυπτρίδα έχει τοποθετηθεί για το DFA. Κατά τη διάρκεια της Τεχνικής IFA του δεύτερου σταδίου επώασης, τα τυχόν δεσμευμένα πρωτογενή αντισώματα σημειώνονται με FITC-συζευγμένο δεύτερο αντίσωμα (το συζυγές). Επίσης η περίσσεια συζεύγματος αφαιρείται με πλύσιμο του slide. Στη συνέχεια τοποθετείται μια καλυπτρίδα στο πλακάκι. Το αντιγόνο/συζυγούς (DFA) ή αντιγόνο/πρωτογενές αντίσωμα/συζυγούς (IFA) σύμπλοκα που σχηματίζονται είναι ορατά με μικροσκοπία φθορισμού σε μεγέθυνση 400 έως 500fold. Η ευαισθησία και η ειδικότητα του συζυγούς/πρωτογενές αντίσωμα μπορεί να διπλοελεγχθεί χρησιμοποιώντας αντίστοιχες πλάκες ελέγχου αντιορού/σύζευξης. Δεν πρέπει να αναδευτεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πλύσιματος! Διαφορετικά, το ακινητοποιημένο αντιγόνο μπορεί να καταστραφεί ή να παρασυρθεί από τη θέση του.

**ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ**

Οι δοκιμασίες Biognost® ανοσοφθορισμού για μικροβιακά αντιγόνα επιτρέπουν την ειδική, ποιοτική ανίχνευση της παράνομης παθογόνου είτε απευθείας στον δείγμα ασθενή ή στο μικροβιακό προϊόν απομόνωσης. Ένα θετικό αποτέλεσμα καθορίζει τη διάγνωση της μόλυνσης με το παθογόνο υπό εξέταση, με την προϋπόθεση ότι έχει εξεταστεί ένα μόνο δείγμα ασθενούς ανά διαφάνεια. Εάν κατά τη δοκιμή λαμβάνονται ένα ή περισσότερα θετικά δείγματα στο ίδιο ή σε διαφορετικά πλακάκια τα δείγματα θα πρέπει να επαναξεταστούν. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πλύσης μπορεί να συμβεί επιμόλυνση μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που υπάρχουν σε διαφορετικές τοποθεσίες εφαρμογής. Σε τέτοιες περιπτώσεις, όλα τα θετικά αποτελέσματα των δοκιμών θα πρέπει να επιβεβαιωθούν ξεχωριστά (εφαρμόστε ένα μόνο δείγμα ανά διαφάνεια και ανά χρώση πηγαδιού).

Ωστόσο, από κοινού με άλλες μεθόδους ανίχνευσης αντιγόνου, ένα αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμής δεν μπορεί ποτέ να αποκλείσει με βεβαιότητα μόλυνση του ασθενούς με το εν λόγω παθογόνο. Υπάρχει πάντα η πιθανότητα ότι ο συγκεκριμένος μολυσματικός παράγοντας δεν εκπροσωπείται στο συγκεκριμένο δείγμα που έχει παρθεί για ανάλυση, ή σε εκείνο το τμήμα του δείγματος που πράγματι χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή. Ως εκ τούτου, εάν τα αρνητικά αποτελέσματα που λαμβάνονται σε περιπτώσεις όπου η συγκεκριμένη μόλυνση έχει βάσιμες υποψίες, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί, κατά προτίμηση σε ένα φρέσκο δείγμα ή το αποτέλεσμα θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με ορολογική δοκιμασία ή με καλλιέργεια.

**BIOGNOST® ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ANIXNEYΣH ANTIΓONΩN**

DFA: Ειδικό Παθογόνο FITC σύζευξης (πολύ/ή μονοκλωνικά, συμπυκνωμένο ή έτοιμο για χρήση)πλακίδια ελέγχου, PBS,υλικό σταθεροποίησης, καλυπτρίδες.

IFA: Ειδικό Παθογόνο σύζευξης (πολύ/ή μονοκλωνικά, συμπυκνωμένο ή έτοιμο για χρήση), δεύτερο αντίσωμα FITC σημασμένο, πλάκες ελέγχου (διαφάνειες επικαλυμμένες με αντιγόνο ελέγχου ή άδειες διαφάνειες με θετικά και αρνητικά εναιωρήματα), PBS,υλικό σταθεροποίησης, καλυπτρίδες.

**ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ**

Πιπέτες ακριβείας και ρύγχη πιπετών για τη διανομή 1-1000 μl

Αναδευτήρας Vortex

Βαθμονομημένο δοχείο των 500 ml ή 1000 ml για την παρασκευή ρυθμισμένου με φωσφορικό αλατούχου διαλύματος

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Υγροποιημένο θάλαμο επώασης

Θερμοκοιτίδα (37 ° C) (προαιρετικά)

Μεγάλα πηγαδάκια χρώσης

Δοχείο διαλύματος πλύσης

Χρονόμετρο

Σκοτεινού πεδίου μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα που επιτρέπουν τη διέγερση στα 450-490 nm και εκπομπή στα 560-590 nm (για την καλύτερη ευαισθησία, το συμβάν διέγερσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατά προτίμηση πάνω από τη διέγερση trans-αποστολή). Μη χρησιμοποιείτε λάδι βυθού.

**ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**

Αποθηκεύστε όλες τις λύσεις αντισωμάτων (πρωτογενή αντισώματα και συζεύξεις), καθώς και τις διαφάνειες ελέγχου στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην ετικέτα. Για να αποτρέψετε από το στέγνωμα τις επικαλυμμένες διαφάνειες με αντιγόνο και τη μετουσίωση πρέπει να φυλάσσεται στην ερμητικά κλειστή πλαστικοποιημένη θήκη αλουμινίου που παρέχεται. Τα μη ανοιγμένα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα εάν οι συστάσεις ακολουθούνται αυστηρώς. Μην χρησιμοποιείτε κάποιο από αυτά τα αντιδραστήρια, αφού έχει λήξει.

Μετά την πρώτη χρήση τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι καλά κλεισμένα και να αποθηκεύονται στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην ετικέτα. Αυτά τα αντιδραστήρια πρέπει να καταναλώνονται το συντομότερο δυνατό.

Σταθερότητα στην επαναχρησιμοποίηση δεν σχετίζεται υποχρεωτικά με την ημερομηνία λήξης.

Το μείγμα σφραγισμένου αέρα ξηρής σκόνης του ορού ρυθμισμένου με φωσφορικά μπορούν να αποθηκεύονται επ 'αόριστον σε θερμοκρασία δωματίου ή παρακάτω εάν δεν έχει ανοιχτεί.

Το υλικό σταθεροποίησης, τα πρότυπα κηλίδωσης και οι καλυπτρίδες μπορούν να αποθηκεύονται επ 'αόριστον σε θερμοκρασία δωματίου. Στην ετικέτα του προϊόντος αναγράφεται η ημερομηνία λήξης. Δεν εξυπηρετεί κανένα άλλο σκοπό παρά να διευκολύνει τον έλεγχο των αποθεμάτων. Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης PBS (pH 7,5) πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα της χρήσης, δεδομένου ότι δεν περιέχει συντηρητικά. Σε περίπτωση που υπάρχει κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα που απέμεινε και θέλετε να το χρησιμοποιήσει την επόμενη ημέρα, θα πρέπει να φυλάσσονται σε κλειστά δοχεία στους 5-10 ° C. Απορρίψτε τυχόν ρυθμιστικό διάλυμα PBS εάν εμφανίζεται θολότητα, χρωματισμός ή κροκιδώδες ίζημα ή αν το pH έχει αλλάξει.

**ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ**

1. Όλα τα δείγματα ασθενών που χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες ανίχνευσης αντιγόνου είναι δυνητικά μολυσματικά και πρέπει να αντιμετωπίζονται με την κατάλληλη φροντίδα.
2. Τα διαλύματα αντισώματος (πρωτογενή αντισώματα και τα συζυγία) και το υλικό σταθεροποίησης περιέχει 0,09% αζίδιο του νατρίου ή κάποιο άλλο συντηρητικό. Όλα τα συντηρητικά είναι δηλητηριώδη. Το αζίδιο που περιέχεται στα αντιδραστήρια δεν πρέπει να έρχεται σε επαφή με χαλκό ή μόλυβδο που περιέχουν αντικείμενα, για παράδειγμα ορισμένων σωλήνων αποχέτευσης, καθώς αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία έκρηξης.
3. Όπως διευκρινίζεται στην ετικέτα του προϊόντος, μερικά από τα προϊόντα σύζευξης περιέχουν τη χρωστική Evans blue για αντιχρωματισμό. Η Evans blue είναι μια

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

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](mailto:bios@bios-world.com)

πιθανή καρκινογόνος ουσία (κατηγορίας I \* δηλητήριο σύμφωνα με το ελβετικό πρόγραμμα δηλητηρία). Οι χρήστες θα πρέπει να προσέχουν να μην καταπιούν αυτές τις συζεύξεις και να αποφεύγουν οποιαδήποτε επαφή με το δέρμα.

4. Οι κανονισμοί ασφαλείας των εμπορικών ενώσεων και του αντίστοιχου Ινστιτούτου (εργαστήριο) θα πρέπει να τηρούνται αυστηρά (βλ ανακοινώσεις, εργαστηριακή κατευθυντήριες γραμμές, οδηγίες για την ασφάλεια κλπ).

5. Κανόνες Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (κατευθυντήριες γραμμές GLP).

6. Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες νομοθετικές ρυθμίσεις και ο χώρος εργασίας πρέπει να απολυμαίνεται.

## ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Δείγμα συλλογής, σταθεροποίηση των δειγμάτων, μεταφορά και προετοιμασία του δείγματος για τον προσδιορισμό συμβάλλουν σημαντικά στη συνάφεια του αποτελέσματος της δοκιμής. Έτσι, πριν από την εκτέλεση προσδιορισμού αντιγόνου Biognost® τα εργαστήρια θα πρέπει να εγκαταστήσουν τη συλλογή του αντιγόνου και τη διαδικασία χειρισμού (μαζί με τους κλινικούς γιατρούς και παθολόγους). Στην περίπτωση των γαστρεντερικών λοιμώξεων, το εν λόγω μικροβιακό αντιγόνο προσδιορίζεται καλύτερα σε δείγματα κοπράνων τα οποία μπορούν να διατηρούνται σε 10% φορμαλίνη. (Διατήρηση με πολυβινυλκοκόλη ή thimerosal-ιώδιο-φορμαλδεΰδης δεν είναι κατάλληλο).

Στην περίπτωση των αναπνευστικών λοιμώξεων, είναι δυνατή ειδική ανίχνευση αντιγόνου, σε κάθε δείγμα που λαμβάνεται από μία από τις ακόλουθες μεθόδους: βρογχοκυψελιδική πλύση, βρογχοσκοπικών βιοψίας, διατραχειακή εισρόφηση, (προκαλούμενα) πτύελα, δείγμα με ξυλαράκι από το λαιμό ή τη ρινοφαρυγγική, παρακέντηση του υπεζωκότα, αυτινία και καλλιέργεια (καλλιέργεια δοκιμής επιβεβαίωσης). Κατά τη χρήση δειγμάτων πτυέλων για τη δοκιμή, προεπεξεργασία των δειγμάτων με διθειο-θρεϊτόλη ή N-acetyl κυστεΐνης μειώνει το ιξώδες των δειγμάτων .

Ο HSV είναι εύκολα ανιχνεύσιμος στο φλυκταινικό υγρό ή φλόκταινα ξέσματα.

Αξιόπιστη ανίχνευση ενδοκυτταρικών μικροβιακών αντιγόνων θεωρείται μόνο εάν το συλλεγόμενο δείγμα περιέχει επαρκή αριθμό των μολυσμένων κυττάρων. Για να διατηρηθεί η μικροβιακή μολυσματικότητα σε περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητή η παράλληλη ανάλυση ή την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των δοκιμών από καλλιέργεια κυττάρων, τα δείγματα θα πρέπει να τοποθετηθούν αμέσως σε ένα κατάλληλο μέσο μεταφοράς, αφού συλλέγονται από τον ασθενή.

## Σταθεροποίηση / Εξουδετέρωση

Για κάθε ασθενή να χρησιμοποιείτε διαφορετική πλάκα. Τοποθετήστε την απαραίτητη ποσότητα δείγματος στη πλάκα και αφήστε την να στεγνώσει τελείως σε θερμοκρασία χώρου (15-20 λεπτά αναλόγως του πάχους του υποστρώματος). Δείγματα που δεν έχουν στεγνώσει στη πλάκα αποκολλώνται εύκολα κατά τη διαδικασία του πλυσίματος. Έπεται η στερέωση του υποστρώματος (θερμαίνοντας αντίστοιχα την ασετόνη την φορμαλίνη και τις πλάκες (μονή –διπλή –η τριπλή στερέωση)). Όταν το επιπλέον διαλυτικό εξατμισθεί από τη πλάκα, είναι έτοιμη για την επώαση του δείγματος με το αντιγόνο-ειδικό αντίσωμα, που είτε είναι μη σημασμένο αντίσωμα για δοκιμασία Ε.Φ(IFA), είτε φθοριόχρωμος σφαιρίνη αντίσωμα για δοκιμασία Α.Φ(DFA). Για τη συλλογή και την προετοιμασία του δείγματος για ενκαρυωτικούς οργανισμούς ανατρέξτε στην βιβλιογραφία.

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε τρέξιμο μια πλάκα ελέγχου για θετικό και αρνητικό έλεγχο του αντιορού ή και του συζυγούς. Αν το πλακίδιο ελέγχου δεν εμφανίζει τις αναμενόμενες αντιδράσεις, η εξέταση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί. Σε περίπτωση που οι πλάκες ελέγχου δεν εμφανίζουν τα επιθυμητά αποτελέσματα ελέγξτε τα εξής: Έχετε οποιαδήποτε εξαρτήματα που έχουν χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία και που δεν είχαν αρχικά προέλθει από τη Bios (π.χ. καλυπτρίδες, υλικό τοποθέτησης κλπ από άλλον προμηθευτή), ήταν το διάλυμα πλύσης πρόσφατα προετοιμασμένο; Οι τυχόν λειτουργικές ελλείψεις που αφορούν το μικροσκόπιο φθορισμού, όπως το λάδι βυθού που έχει πέσει στους αντικειμενικούς φακούς, κακή οπτική προσαρμογή, αδύναμη πηγή φωτός; Οι διαφάνειες και τα αντιδραστήρια έχουν αποθηκευτεί σωστά ή έχουν οποιαδήποτε εξαρτήματα που έχουν χρησιμοποιηθεί τα οποία έχουν ήδη λήξει; Ήταν ο θάλαμος επώασης σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (δεν πρέπει να επιτραπεί κατά τη διάρκεια της εφαρμογής, την επεξεργασία διαφάνειας να στεγνώσουν σε οποιοδήποτε στάδιο); Αφήστε τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοότητα δωματίου με φυσικό τρόπο και όχι με τη θέρμανση αυτών.

Για να αποφύγετε την μη υποθήκευση ή την καταστροφή του σταθερού αντιγόνου, μην ανακατεύετε κατά τη διάρκεια των διαδικασιών πλύσης.

Η Εγγύηση από τη Bios παρατείνεται μόνο εάν οι οδηγίες χρήσης ακολουθούνται αυστηρώς, εάν τα αποκλειστικά προϊόντα της Bios που εφαρμόζονται επαληθευθούν στη δοκιμή, και εάν η δοκιμή πραγματοποιείται από εξειδικευμένο προσωπικό.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι Biognost® συζεύξεις για την άμεση τεχνική ανοσοφθορισμού είναι διαθέσιμη σε μια εύκολη και έτοιμη προς χρήση μορφή, αν για κάποιο τυπογραφικό λόγο δεν αναγράφεται καμία λειτουργία της αραιώσης στην ετικέτα. Μετά την απόφυξη, τα έτοιμα προς χρήση προϊόντα συζεύξης μπορεί να χρησιμοποιηθούν άμεσα στην πορεία της δοκιμής. Μερικές συζεύξεις είναι διαθέσιμες ως συμπυκνωμένο διάλυμα απόθεμα και η αραιώση αναγράφεται στην ετικέτα. Εάν δεν αναγράφονται στην ετικέτα ο τρόπος αραιώσης, ο χρήστης πρέπει να καθορίσει τη βέλτιστη αραιώση εργασίας του συμπυκνωμένου συζυγούς (στη δοκιμή "συζυγούς συμπύκνωμα»). Ωστόσο, ο αραιωμένο συζυγής χρήση δεν είναι σταθερό για παρατεταμένες περιόδους συνεπώς ένα φρέσκο διάλυμα εργασίας θα πρέπει να είναι προετοιμασμένο για κάθε δοκιμή. Για την έμμεση τεχνική ανοσοφθορισμού, Biognost® πρωτογενή αντισώματα, καθώς και τα δευτερεύοντα αντισώματα (συζεύγματα) παρέχονται τακτικά σε αυτήν ως έτοιμα προς χρήση αντιδραστήριων. Διαφορετικά, η αραιώση αναγράφεται στην ετικέτα.

### I. Δοκιμασία άμεσου ανοσοφθορισμού (DFA):

- Μοιράστε στη πλάκα την απαιτούμενη ποσότητα (μία ή περισσότερες σταγόνες) είτε των έτοιμων προς χρήση ή η κατάλληλως αραιωμένου συζυγούς έτσι ώστε τα σταθερά δείγμα ασθενούς να καλύπτεται πλήρως.
- Επώαστε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37 ° C (ενδοκυτταρικούς οργανισμούς) σε θάλαμο επώασης με κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Προστατέψτε τις διαφάνειες από το άμεσο ηλιακό φως. Διατηρείστε μακριά από θερμαντικά σώματα.
- Αφαιρέστε τις πλάκες από το θάλαμο, απομακρύνετε το επιπλέον υγρό και ξεπλύνετε προσεκτικά τις πλάκες με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. (μην ψεκάζετε απευθείας στά πηγαδάκια αλλά ενδιάμεσα!)
- Βυθίστε τις πλάκες δυο φορές από 5 λεπτά σε ένα μπανάκι αλατόνευρο ρυθμισμένο με φωσφορικό. Χρησιμοποιείστε μεγάλα μπανάκια χρώσης και να αλλάξετε το buffer μεταξύ των κύκλων. Μην αναδεύετε τις πλάκες στο μπάνιο ρυθμιστικό.
- Στεγνώστε τις πλάκες με απορροφητικό χαρτί . Το υπόστρωμα δεν πρέπει να αφήνεται να στεγνώσει.
- Εφαρμόστε τις καλυπτρίδες τοποθετώντας 2-3 στάγόνες μέσω σταθεροποίησης σε κάθε διαφάνεια και, για να αποφευχθεί η παγίδευση φυσαλίδων αέρα, εφαρμόστε την καλυπτρίδα από το ένα άκρο της πλάκας προς το άλλο. Το επιπλέον υλικό σκουπίζεται με χαρτοπετσέτα ποτισμένη με διάλυμα πλύσης (PBS) μόνο στο πλάι για να μην χαραχθεί η επιφάνεια της πλάκας στο μικροσκόπιο ή με τη βάση του κουτιού αποθήκευσης διαφάνειών. Αξιολογήστε τις διαφάνειες με μικροσκόπιο φθορισμού. Για καλύτερα αποτελέσματα αυτό θα πρέπει να γίνει αμέσως. Εναλλακτικά, οι διαφάνειες μπορούν να αποθηκευτούν μέχρι και δύο ώρες σε ένα σκοτεινό και δροσερό μέρος και πρέπει να προστατεύονται από την αποξήρανση.

### II. Δοκιμασία Έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA):

- Μοιράστε στη πλάκα την απαιτούμενη ποσότητα αρχικού αντισώματος (μία ή περισσότερες σταγόνες), έτσι ώστε το δείγμα ασθενούς να καλύπτεται πλήρως.
- Επώαστε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37 ° C (ενδοκυτταρικούς οργανισμούς) σε θάλαμο επώασης με κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Προστατέψτε τις διαφάνειες από το άμεσο ηλιακό φως, και κρατήστε μακριά από θερμαντικά σώματα.
- Αφαιρέστε τις διαφάνειες από το θάλαμο, απομακρύνετε το επιπλέον υγρό και ξεπλύνετε προσεκτικά τις διαφάνειες με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. (Η ροή ρυθμιστικού δεν πρέπει να είναι απευθείας πάνω στις θέσεις εφαρμογής!)
- Βυθίστε τις πλάκες δυο φορές από 5 λεπτά σε μπανάκι με διάλυμα πλύσης, χρησιμοποιείστε μεγάλα πηγαδάκια χρώσης και να αλλάξετε buffer μεταξύ των κύκλων. Μην αναδεύετε τις διαφάνειες στο μπάνιο.
- Στεγνώστε τις πλάκες με απορροφητικό χαρτί . Το υπόστρωμα δεν πρέπει να αφήνεται να στεγνώσει.

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

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](mailto:bios@bios-world.com)

6. Εφαρμόστε το κατάλληλο συζυγές (FITC-επισημασμένο δευτερογενές αντίσωμα) προς την διαφάνεια, όπως περιγράφεται στο βήμα 1.
7. Επόαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε θάλαμο επώασης με καταλληλες συνθήκες υγρασίας. Προστατέψτε τις διαφάνειες από το άμεσο ηλιακό φως και να κρατήσετε μακριά από θερμαντικά σώματα.
8. Επαναλάβετε τα βήματα 3-5.

#### **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Οι διαφάνειες ελέγχονται σε μεγέθυνση 400 έως 500fold (γενική άποψη σε 100fold μεγέθυνση) από ένα μικροσκόπιο φθορισμού σκοτεινού πεδίου (εύρος φίλτρου: 450-490 nm). Για να αποφευχθεί η απώλεια της ευαισθησίας από φωτολευκάνση δεν θα πρέπει να παραμείνει στο ίδιο οπτικό πεδίο περισσότερο από όσο πραγματικά είναι απαραίτητο για την αξιολόγηση. Για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει να εξεταστούν όσο περισσότερα βοηθία είναι εφικτά σε σύντομες συνεδρίες.

Οι προετοιμασίες των διαφάνειών θα πρέπει να αξιολογούνται αμέσως με το μικροσκόπιο μετά το τελευταίο βήμα επεξεργασίας. Εάν αυτό είναι αδύνατο, οι διαφάνειες που παρασκευάζονται πρέπει να αποθηκεύονται σε σκοτεινό δροσερό μέρος και καλά προστατευμένο από ξήρανση. Για μακροχρόνια διατήρηση - για παράδειγμα, αν τα παρασκευάσματα πρόκειται να διατηρηθούν για διδακτικούς σκοπούς - θα πρέπει να σφραγίζονται με βερνίκι νυχιών κατά μήκος των άκρων της καλυπτρίδας και να αποθηκεύονται στους ή κάτω από τους -20 ° C.

#### **Πρότυπα χρώσης ανοσοφθορισμού:**

Κατά την αξιολόγηση των διαφανειών, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μόνο η χρώση των χαρακτηριστικών μικροβιακών δομών.

##### **Θετικός:**

Ο ειδικός φθορισμός δείχνει ένα χαρακτηριστικό φθορισμό ανοικτού πράσινου μήλου. Συνήθως, η ένταση της βαθμολογείται σε μια κλίμακα από 1+ (ασθενής), μέσω 2+ (ενδιάμεσο), 3+ (φωτεινό) έως 4+ (πολύ φωτεινό).

Ένα δείγμα θεωρείται θετικό για το υπό ανίχνευση παθογόνο εάν υπάρχει φθορισμός παθογόνου που αξιολογείτε με  $\geq 1$

##### **Αρνητικός:**

Φθορισμός χαμηλότερος από 1+ θεωρείται αρνητικός. Κάθε κιτρινωπή ή σκουροπράσινη απόχρωση αγνοείται.

#### **Στοχεύουν αντιγόνα και δομές στόχο:**

Τα αντιδραστήρια αντισώματος Biognost® είναι ειδικά αντιγόνα, χαρακτηριστικά για τον εντοπισμό παθογόνων (βακτήρια, CPE, κ.λπ.). Εάν ο φθορισμός του μικροσκοπίου εμφανίζει ένα ευδιάκριτο φθορισμό ανοικτού πράσινου μήλου, των οποιωνδήποτε τέτοιων δομών παθογόνου, το εξεταζόμενο δείγμα θεωρείται θετικό, ήδη η παρουσία μιας ενιαίας δομής αντιγόνου φθορισμού είναι επαρκής απόδειξη ότι ο ασθενής έχει προσβληθεί από τον παθογόνο που διερευνάτε.

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα πρέπει πάντα να ερμηνεύονται στο πλαίσιο της γενικής κλινικής εικόνας, το χρονοδιάγραμμα της συλλογής δείγματος και άλλα εργαστηριακά ευρήματα.

#### **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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