

**Instrukcja używania testu BIOGNOST® ANTYGEN**

**DFA:** Wykrywanie antygenów techniką immunofluorescencji bezpośredniej: Jednostopniowa technika oparta o znakowane za pomocą FITC przeciwciała mono- lub poliklonalne

**IFA:** Wykrywanie antygenów techniką immunofluorescencji pośredniej: Technika dwustopniowa oparta o pierwotne przeciwciała mono- lub poliklonalne oraz znakowane za pomocą FITC, przeciwciała wtórne

**PRZEZNACZENIE**

Biognost® Ag DFA jest bezpośrednim, a Biognost® Ag IFA pośrednim testem do jakościowego oznaczenia patogenu z materiału pacjenta bezpośrednio po pobraniu. Test Biognost® Ag jest przeznaczony do użycia w diagnostyce *in vitro*.

**ZASADA DZIAŁANIA TESTU**

Test oparty jest o klasyczną metodę immunofluorescencyjną.

Próbka badana umieszczana jest na szkiełku mikroskopowym i poddawana odpowiedniej procedurze utrwalania (patrz rozdział "Pobieranie i przygotowywanie próbek"). Następnie jest pokrywana odczynnikami z przeciwciałem o odpowiedniej specyfikacji antygeny, albo przeciwciałem sprzężonym z fluoresceiną (DFA) albo nieznakowaną antysurowicą/przeciwciałem pierwotnym (IFA), i poddawana inkubacji. W przypadku próbki pozytywnej, przeciwciała mono- lub poliklonalne będą się wiązały ze specyficznymi antygenami bakteryjnymi. Nadmiar przeciwciał jest następnie usuwany poprzez płukanie płytki testowej za pomocą dostarczonego buforu płuczającego (myjącego).

Dla DFA szkiełko nakrywkowe jest zamontowane.

Dla IFA podczas drugiej inkubacji wszelkie związane przeciwciała pierwotne znakowane są za pomocą drugiego przeciwciała sprzężonego z FITC (koniugat).

Nadmiar koniugatu usuwany jest przez ponowne mycie szkiełka. Dopiero wtedy szkiełko przykrywkowe jest montowane.

Tworzone kompleksy antygen/koniugat (DFA) lub antygen/przeciwciała pierwotne/koniugat (IFA) są uwidocznione w mikroskopie fluorescencyjnym przy powiększeniu od 400 do 500 razy. Czułość i specyficzność kompleksu koniugat/przeciwciała pierwotne może być podwójnie sprawdzona przy pomocy odpowiednich szkiełek (płytek) kontrolnych antysurowica/koniugat.

Nie mieszać podczas procedury mycia! W przeciwnym razie unieruchomiony antygen może zostać uszkodzony lub wypłukany.

**OGRANICZENIA PROCEDURY**

Testy immunofluorescencyjne Biognost® na antygeny bakteryjne pozwalają na specyficzną, jakościową wykrycie szkodliwych patogenów albo bezpośrednio w próbce od pacjenta albo w izolacie bakteryjnym. Wynik pozytywny stanowi diagnozę zakażenia rozpatrywanym patogenem, jeśli na danym szkiełku nie badano więcej niż jedną próbkę od pacjenta. Jeśli uzyskuje się więcej niż jeden wynik pozytywny, przy badaniu różnych próbek pacjenta na tym samym szkiełku (lub na różnych szkiełkach, które były traktowane w tych samych pojemnikach do barwienia), pozytywne wyniki badań powinny być powtórnie sprawdzone. Podczas procedury mycia mogą się zdarzyć wzajemne zanieczyszczenia pomiędzy różnymi próbkami nakładanymi w różnych miejscach. W takich przypadkach wszystkie pozytywne wyniki testu powinny być potwierdzone indywidualnie (nakładanie tylko jednej próbki na szkiełko i do pojemnika do barwienia).

Jednak podobnie jak w innych metodach wykrywania antygenów, negatywny wynik testu nigdy nie będzie z całą pewnością wykluczać infekcji pacjenta przedmiotowym patogenem. Istnieje zawsze możliwość, że określony czynnik zakaźny nie występuje w danej próbce pobranej od pacjenta do analizy, lub w tej części próbki, która była użyta do testu. Dlatego też, kiedy uzyskuje się wyniki negatywne tam, gdzie określona infekcja jest szczególnie podejrzana, test powinien zostać powtórzony, najlepiej na świeżej próbce. Ewentualnie wynik powinien być potwierdzony badaniem serologicznym lub przez posiew.

**REAGENTY BIOGNOST® DO TESTU ANTYGENOWEGO**

**DFA:** Koniugat specyficzny dla patogenu zamarkowanego FITC (poli- lub monoklonalnego, gotowy do użycia lub koncentrat), szkiełka kontrolne, PBS, osadzona pożywka, szkiełka nakrywkowe; patrz aktualny cennik Bios®.

**IFA:** Przeciwciała specyficzne dla patogenu (poli- lub monoklonalnego, gotowe do użycia lub koncentrat), znakowane za pomocą FITC wtórne przeciwciała, kontrolne szkiełka (puste lub pokryte antygenem szkiełka z zawiesiną pozytywną lub negatywną), PBS, osadzona pożywka, szkiełka nakrywkowe; patrz aktualny cennik Bios.

**MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE DODATKOWE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE**

Pipety automatyczne i końcówki do pipet o pojemnościach. 1-1000 µl

Mikrowytrząsarka np. typ Vortex

Cylinder miarowy 500 ml lub 1000 ml do przygotowywania roztworu solankowego buforowanego fosforanem

Woda destylowana lub dejonizowana

Nawilżana komora inkubacyjna

Inkubator (37°C) (opcjonalnie)

Pojemnik do barwienia

Butelka na bufor myjący

Stoper z Timerem

Mikroskop fluorescencyjny z ciemnym polem, z filtrami pozwalającymi na wzbudzenie w zakresie 450-490 nm i emisję w zakresie 560-590 nm (dla jak najlepszej czułości powinny być używane pojedyncze wzbudzenia, które mają przewagę w stosunku do wzbudzeń transmisyjnych)

Nie używać olejku immersyjnego.

**PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ**

Roztwory wszystkich przeciwciał (przeciwciał pierwotnych i koniugatów) oraz szkiełka kontrolne należy przechowywać w temperaturze podanej na etykiecie. Aby zapobiec wysychaniu szkiełek pokrytych przeciwciałem (szkiełka kontrolne), należy je przechowywać w odpowiednio zamkniętej torebce z laminowanego aluminium. Jeśli ściśle przestrzega się zaleceń dotyczących przechowywania, wszystkie te komponenty są stabilne, aż do terminu przydatności podanego na etykiecie.

Nie należy używać żadnych komponentów przeterminowanych.

Hermeticznie zamknięta sucha mieszanina soli buforowanej fosforanem, osadzona pożywka oraz szkiełka nakrywkowe mogą być przechowywane bez ograniczeń w temperaturze pokojowej lub niższej. Termin przydatności tych produktów znajduje się na etykiecie i służy tylko celowi łatwej kontroli magazynowej.

Bufor myjący PBS (pH 7.5), powinien być świeżo przygotowany w dniu jego użycia, ponieważ nie zawiera środków konserwujących. Niewykorzystany roztwór buforowy można użyć następnego dnia, jeśli był przechowywany pod odpowiednim przykryciem w temperaturze 5-10°C. W razie pojawienia się zmętnienia zabarwienia, kłaczkowatego osadu albo zmiany pH bufor PBS należy usunąć.

**ŚRODKI BEZPIECZEŃSTWA**

1. Wszystkie próbki od pacjentów używane w testach wykrywania antygenów są potencjalnie zakaźne i należy się z nimi obchodzić z należytą ostrożnością
2. Roztwory przeciwciał (przeciwciała pierwotne i koniugaty) oraz osadzona pożywka zawierają 0.09% azydek sodowy lub inny środek konserwujący. Wszystkie środki konserwujące są trujące. Nie można dopuścić do kontaktu odczynników zawierających azydki z przedmiotami zawierającymi miedź lub ołów, np. określonych rur odpływowych, ponieważ może to doprowadzić do tworzenia się wybuchowych azydków metali.
3. Jak to określono na etykiecie produktu, niektóre z koniugatów zawierają jako barwnik błękit Evansa, który jest możliwym karcinogenem (klasa I trucizn, zgodnie z Szwajcarską listą trucizn). Pomimo że stężenie barwnika jest bardzo niskie (maksymalnie 0.2 mg/ml), użytkownicy powinni uważać, aby te koniugaty nie miały

kontakty ze skórą.

4. Powinny być zawsze przestrzegane wytyczne dotyczące Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP).

5. Materiały i odczynniki użyte w testach muszą być dezynfekowane i usuwane zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa.

**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

## POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Pobieranie próbek, ich stabilizacja, transport i przygotowanie próbki do testu wpływają w znacznym stopniu na dokładność wyników testu. Przed prowadzeniem testów antygenowych Biognost® laboratoria powinny wprowadzić procedurę pobierania antygenów i obchodzenia się z nimi (wspólnie z klinicystami i patologami). W przypadku infekcji żołądkowo-jelitowych przedmiotowy antygen bakteryjny najlepiej jest określać w próbkach stolca, które można konserwować w 10% formalinie. (Konserwacja za pomocą alkoholu poliwinylowego lub tiomerosalu-jodu-formaldehydu nie jest odpowiednia).

W przypadku infekcji układu oddechowego, wykrywanie specyficznego antygeny możliwe jest w każdej próbce otrzymanej jedną z następujących metod: płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe, biopsja bronchoskopowa, aspiracja przez zchwawicza, (wywołwana) plwocina, wymaz z gardła lub nosowo-gardłowy, nakłucie opłucnej, autopsja i hodowla (test potwierdzający przez posiew).

Przy używaniu do badań próbek płwociny wstępne potraktowanie próbek za pomocą dithio-threitolu lub N-acetylocysteiny zmniejsza lepkość próbki.

HSV jest łatwo wykrywalne w płynie pęcherzykowym lub w wyskrobinach pęcherzykowych.

Niezawodne wykrywanie wewnątrzkomórkowych antygenów bakteryjnych jest możliwe tylko wówczas, gdy pobrana próbka zawiera dostateczną ilość zainfekowanych komórek. W celu zachowania zakaźności bakteryjnej w przypadkach kiedy pożądana jest analiza równoległa lub potwierdzenie wyników testu poprzez posiew komórek, pobrane od pacjenta, próbki powinny być natychmiast przeniesione do odpowiedniego środka transportowego.

## Utrwalanie/Inaktywacja:

Dla każdego pacjenta stosuje się osobne szkiełko. Nałożyć odpowiednio przygotowaną próbkę na szkiełko testowe i pozwolić na jej całkowite wyschnięcie w powietrzu o temperaturze pokojowej (15-30 min, zależnie od grubości substratu). Proszę zauważyć, że próbki, które nie zostały odpowiednio wysuszone na szkiełku, mają tendencję do łatwego oddzielania się podczas etapu mycia. Następnie szkiełko testowe poddawane jest utrwalaniu za pomocą ciepła i/lub acetonu i/lub formaliny (utrwalanie jedno- dwu- lub trzypostopniowe). Po odparowaniu z płytki całości pozostałego rozpuszczalnika, próbka jest gotowa do inkubacji z przeciwciałem specyficznym dla antygeny, to jest albo z nieznanym przeciwciałem pierwotnym przy pośredniej technice immunofluorescencyjnej (IFA) albo przeciwciałem sprzężonym z fluoresceiną przy bezpośredniej technice immunofluorescencyjnej (DFA). Dla pobrania i przygotowania próbki dla eukariontów proszę odnosić się do aktualnej literatury

## KONTROLA JAKOŚCI ORAZ USUWANIE PROBLEMÓW

Do każdej partii badań powinna być dołączana płytka kontrolna do pozytywnej i negatywnej kontroli antysurowicy i/lub koniugatu. Jeśli szkiełko kontrolne nie pokazuje oczekiwanych reakcji, test jest nieważny i musi zostać powtórzony.

W przypadku, gdy szkiełka kontrolne nie pokazują wyników doskonałych, należy sprawdzić: czy użyte do testu komponenty były oryginalnie dostarczone przez Bios (np. osadzona pożywka, szkiełka nakrywkowe itp. czy od innego dostawcy); czy bufor był świeżo przygotowany; czy są jakiegokolwiek braki funkcjonalne dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego (takie jak smugi oleju na obiektywie, zła regulacja optyczna, słabe źródło światła); czy płytki i odczynniki były prawidłowo przechowywane lub czy były zastosowane komponenty przeterminowane; czy komora inkubacyjna była odpowiednio nawilżona (podczas obróbki szkiełek miejsca nałożenia nie mogą wyschnąć na żadnym etapie), czy szkiełka były oznakowane markerem z miękką końcówką itp. Nigdy nie należy przyspieszać procesu podgrzewania odczynników przez dostarczanie ciepła.

## PROCEDURA TESTU

Koniugaty Biognost® do bezpośredniej techniki immunofluorescencyjnej są dostępne w wygodnej, gotowej do użycia formie, o ile na etykiecie nie podano sposobu rozpuszczania. Po rozmrożeniu, gotowe do użycia koniugaty mogą być bezpośrednio stosowane do wykonywania testu. Niektóre koniugaty są dostępne jako roztwory stężone i należy je rozpuszczać zgodnie ze wskazaniami na etykiecie. O ile na etykiecie nie podano sposobu rozpuszczania, użytkownik musi określić optymalny stopień rozcieńczenia koniugatu stężonego (napis na etykiecie „koncentrat koniugatu”). Jednak koniugat rozpuszczany przez użytkownika nie jest stabilny przez dłuższy czas i dlatego dla każdego testu trzeba przygotowywać, świeży roztwór roboczy. Do pośredniej techniki immunofluorescencyjnej przeciwciała pierwotne tak jak i wtórne przeciwciała (koniugaty) Biognost® są zwykle dostarczane jako odczynniki gotowe do użycia. W przeciwnym razie stopień rozcieńczenia podano na etykiecie.

### I. Bezpośredni test immunofluorescencyjny (DFA):

1. Nałożyć na szkiełko mikroskopowe odpowiednią ilość (jedną lub kilka kropli) gotowego do użycia albo odpowiednio rozcieńzonego koniugatu, tak aby utrwalona próbka badana została całkowicie pokryta.
2. Inkubować płytki przez 30 minut w temperaturze pokojowej lub w 37°C (wewnątrzkomórkowe organizmy) nawilżanej komorze inkubacyjnej. Chronić płytki przed bezpośrednim światłem słonecznym; trzymać z daleka od grzejników.
3. Wyjąć szkiełka z komory, zlać nadmiar płynu i ostrożnie wypłukać buforem płuczącym. (Nie kierować strumienia buforu bezpośrednio na miejsca nałożenia!)
4. Zanurzyć szkiełka na 2x 5 min w kąpeli z buforu; używać dużych pojemników do barwienia i wymieniać bufor pomiędzy cyklami. Nie poruszać szkiełkami w kąpeli buforowej.
5. Za pomocą papieru absorpcyjnego szkiełka osuszyć wokół miejsca nałożenia. Nie można pozwolić na tym etapie na wyschnięcie substratu. Dlatego należy natychmiast przejść do punktu 6.
6. Nałożyć szkiełka nakrywkowe umieszczając 2 lub 3 krople pożywki na każde szkiełko i unikając uwięzienia pęcherzyków powietrza, ostrożnie opuścić szkiełko nakrywkowe od jednego do drugiego końca. Wypływający nadmiar pożywki powinien być wytarty papierowym ręcznikiem zwilżonym buforem, aby zapobiec przyklejaniu się szkiełek do stolika mikroskopu lub do podstawy pojemnika do przechowywania szkiełek. Dokonać oceny preparatów za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Najlepsze wyniki uzyskuje się wykonując to natychmiast. Alternatywnie szkiełka mogą być przechowywane do dwóch godzin w ciemnym i chłodnym miejscu i powinny być zabezpieczone przed wysychaniem.

### II. Pośredni test Immunofluorescencyjny (IFA):

1. Nałożyć na szkiełko mikroskopowe odpowiednią ilość (jedną lub kilka kropli) przeciwciała pierwotnego tak, aby utrwalona próbka pobrana od pacjenta, została całkowicie pokryta.
2. Inkubować płytki przez 30 minut w temperaturze pokojowej lub w 37°C (wewnątrzkomórkowe organizmy) nawilżonej komorze inkubacyjnej. Chronić szkiełka przed bezpośrednim światłem słonecznym; trzymać z daleka od grzejników.
3. Wyjąć szkiełka z komory, zlać nadmiar płynu i ostrożnie wypłukać buforem płuczącym. (Nie kierować strumienia bufora bezpośrednio na miejsca nałożenia!)
4. Zanurzyć szkiełka na 2 x 5 min w kąpeli z buforu; używać dużych pojemników do barwienia i wymieniać bufor pomiędzy cyklami. Nie poruszać szkiełkami w kąpeli buforowej.
5. Za pomocą papieru absorpcyjnego osuszyć szkiełka wokół miejsca nałożenia. Na tym etapie nie można pozwolić na wyschnięcie podkładu. Dlatego należy natychmiast przejść do punktu 6.
6. Zastosować odpowiedni koniugat (oznakowane za pomocą FITC przeciwciała wtórne), dla szkiełka jak to opisano w punkcie 1.
7. Inkubować 30 min. w temperaturze pokojowej w nawilżonej komorze inkubacyjnej. Chronić szkiełka przed bezpośrednim światłem słonecznym; trzymać z daleka od grzejników.
8. Powtórzyć punkty 3-5.
9. patrz I., 6.

## OCENA SZKIEŁEK I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Szkiełka powinny być oglądane przy powiększeniu 400 do 500x (widok ogólny przy powiększeniu 100x) pod mikroskopem fluorescencyjnym z ciemnym polem widzenia (zakres filtru: 450-490 nm). Aby uniknąć straty czułości w wyniku fotowysbielania, nie należy pozostawiać w tym samym polu widzenia dłużej, niż jest to rzeczywiście niezbędne do oceny. W celu uzyskania najlepszych wyników powinno się w szybkiej sekwencji oglądać tak wiele pól, jak to jest praktycznie możliwe. Preparaty na szkiełkach powinny być oceniane pod mikroskopem niezwłocznie po wykonaniu ostatniej fazy obróbki. Jeśli jest to niemożliwe, przygotowane szkiełka muszą być przechowywane w ciemnym i chłodnym miejscu oraz dobrze zabezpieczone przed wysychaniem. W celu konserwacji długoterminowej - jeśli na przykład preparaty mają być przechowywane do celów szkoleniowych - muszą one być zamknięte na krawędziach szkiełek nakrywkowych za pomocą przezroczystego lakieru do paznokci i przechowywane w temperaturze -20°C lub niższej.

## Charakterystyki zabarwienia immunofluorescencji (interpretacja wyników):

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionstix®, 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

podczas oceny szkiełek muszą być brane pod uwagę tylko charakterystyczne zabarwienia struktur bakteryjnych.

**Pozytywne:**

Specyficzna fluorescencja wykazuje charakterystyczny jasnozielony kolor. Intensywność barwy jest zwykle klasyfikowana w skali od 1+ (słaby), poprzez 2+ (średni), 3+ (jasny) do 4+ (bardzo jasny).

Próbka jest uznawana za pozytywną na badany patogen, jeśli widzialna jest fluorescencja o strukturach typowych dla, patogenu która jest oceniana, na co najmniej 1+.

**Negatywna:**

Ocena fluorescencji poniżej 1+ oznacza wynik negatywny. Fluorescencja żółtawa lub ciemnozielona jest niespecyficzna i nie może być brana pod uwagę.

**Badany antygen i badane struktury:**

Odczynniki z przeciwciałami Biognost® specyficznie rozpoznają struktury antygenów, które są charakterystyczne dla badanego patogenu (bakterie, CPE, itp.). Jeśli badanie mikroskopem fluorescencyjnym ujawnia wyraźnie widzialną, jasnozieloną fluorescencję o strukturze takiego patogenu, badana próbka jest uznawana za pozytywną; już sama obecność pojedynczej struktury fluorescencyjnej patogenu jest wystarczającym dowodem na to, że pacjent jest zakażony badanym patogenem. W każdym przypadku wyniki należy zawsze interpretować w kontekście ogólnego obrazu klinicznego, czasu pobrania próbki oraz innych spostrzeżeń laboratoryjnych.

**LITERATURA**

1. Riggs J.L., Sieward 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