

Istruzioni per l'uso BIOSAVE® Rivelazione dell'ANTIGENE

CE

Rivelazione dei PATOGENI UMANI nel siero umano, liquor o feci mediante AGGLUTINAZIONE al lattice.

Tempo totale d'analisi: circa 7 minuti fino a un massimo di 25 minuti (trattamento con pronase)

FINALITÀ D'USO

Il Biosave® Antigene (Biosave® Ag) è un metodo rapido per la determinazione qualitativa dell'antigene nel siero umano, liquor e feci. Realizzato quale ausilio per la diagnostica in vitro.

PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi è basata sul metodo dell'agglutinazione al lattice (agglutinazione indiretta). Le particelle di lattice, opportunamente ricoperte con anticorpi di coniglio diretti contro l'antigene, si presentano in sospensione stabilizzata; i campioni dei pazienti ed il reattivo vengono posti nel pozzetto della piastra d'agglutinazione e miscelati. Ciascun antigene autologo presente nel campione si legherà agli anticorpi specifici presenti sulle particelle di lattice formando un visibile agglutinato. Se non vi saranno antigeni nel campione in esame, non si vedrà agglutinazione e la miscela dei prodotti sulla piastra rimarrà bianco-lattiginosa e torbida.

Reazioni aspecifiche (es: quelle dovute al fattore reumatoide, possono essere evidenziate eseguendo un'analisi in parallelo con reagente di controllo): Le particelle al lattice del reagente di controllo sono ricoperte con normali immunoglobuline di coniglio. In molti casi le proteine sono le responsabili per queste reazioni aspecifiche. Le proteine possono essere distrutte con proteasi pronase. Se l'antigene non è una proteina, il trattamento con pronase aumenta la specificità dell'analisi. L'interferenza da fattori reumatici può anche essere eliminata mediante pretrattamento con adsorbente anti IgG antiumana (Biosorb®).

LIMITI METODOLOGICI

Le tecniche di agglutinazione al lattice Biosave® Antigene sono impiegate per la determinazione qualitativa del rispettivo antigene. I risultati d'analisi negativi per l'antigene non escludono l'infezione. Si ricorda comunque agli utilizzatori che la definizione di una situazione clinica non dovrebbe essere basata su singoli risultati ma questi, dovrebbero essere sempre interpretati nel contesto delle relative informazioni generali. Per confermare i dati negativi ed equivoci, si raccomanda di ripetere l'analisi su un nuovo campione.

REAGENTI BIOSAVE®

Reagente per determinazione con lattice : sospensione stabilizzata di particelle al lattice con adesio anticorpi da coniglio contro un antigene specifico, pronto all'uso, in flacone gocciolatore.

Reagente di controllo al lattice : sospensione stabilizzata di particelle al lattice con adesio una normale globulina di coniglio, pronta all'uso, in flacone gocciolatore.

Controllo anticorpo : siero di capra anti coniglio.

Controllo positivo : estratto di antigene stabilizzato, pronto all'uso, in flacone gocciolatore.

Controllo negativo : siero umano stabilizzato, senza anticorpi agglutinanti, liofilizzato.

Reagente pronase : per il trattamento dei campioni di siero, liofilizzato.

Tampone diluente : tampone per la diluizione del campione, pronto all'uso.

Cartoncini di reazione a gettare.

Istruzioni per l'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Pipette di precisione e puntali per dispensare campioni e controlli

Agitatore meccanico (opzionale)

Cronometro

Lampada ad incandescenza ad alta intensità (opzionale)

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare Biosave® Reagente al lattice ed i controlli a 5-10 °C. In queste condizioni i reattivi sono stabili fino alla data di scadenza indicata. Non usare alcun componente se scaduto. Non congelare il reagente al lattice altrimenti avviene una reazione irreversibile di coagulazione. Le piastre di agglutinazione possono essere conservate indefinitamente a temperatura ambiente.

PRECAUZIONI PER LA SICUREZZA

1. Il controllo positivo contiene estratti di antigene e deve essere considerato potenzialmente infetto, quindi manipolato con cura.
2. Tutti i sieri umani utilizzati per la produzione dei controlli positivi e negativi sono stati analizzati e risultano essere negativi per anticorpi HbsAg e HIV. Comunque questi reagenti devono essere considerati come potenzialmente infetti e manipolati con l'adeguata attenzione.
3. Tutti i reagenti liquidi e i controlli, contengono sodio azide o thiomersal; la sodio azide è velenosa. Non inalare o ingerire ed evitare il contatto con la pelle e gli occhi. L'azide contenuta nei reattivi non deve essere messa a contatto con oggetti contenenti rame o piombo, es. certe tubazioni di scarico, in quanto può portare alla formazione di azide metallica esplosiva.
4. Seguire e rispettare strettamente le direttive per la sicurezza in laboratorio dei rispettivi istituti (le guide di laboratorio, gli aggiornamenti, le istruzioni di sicurezza etc.).
5. Si raccomanda di seguire le attuali direttive definite da 'GLP' (Good Laboratory Praticce).
6. Materiali e reagenti usati nell'analisi devono essere messi a rifiuto/eliminati in accordo con quanto disposto dalla legislazione vigente.

MATERIALE NECESSARIO PER IL TEST

Il siero o il liquor sono entrambi idonei per il test. Il siero/liquor sono stabili per circa 1 settimana se mantenuti a 5-10°C. Se viene richiesta la ripetizione dell'analisi o una conservazione dei campioni per lunghi periodi gli stessi dovrebbero essere conservati a -20°C.

Siero:

Si raccomanda il trattamento preliminare di tutti i campioni di siero mediante Pronase per una migliore specificità del test.

1. Aggiungere 200 µl di siero a 200 µl di soluzione Pronase. Chiudere bene il flacone.

2. Incubare il siero/soluzione Pronase a 56°C. per 15 minuti.

3. Far bollire subito il siero/soluzione Pronase per 5 minuti esatti onde portare a termine la digestione enzimatica.

4. Lasciare raffreddare la soluzione a temperatura ambiente prima di eseguire il test. In caso di titolazione ricordarsi che il campione dei pazienti è stato diluito 1:2 con la soluzione Pronase.

Liquido cefalorachidiano:

Il liquor deve essere inattivato facendolo bollire in bagnomaria per 5 minuti prima di ogni test. Questa manipolazione limita la presenza di interferenze non specifiche.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Ricostituire i seguenti reagenti con il volume di acqua deionizzata o distillata indicato.

Inattivare con il calore (56°C, 30 min) il **controllo negativo** ogni giorno che si usa il kit.

CONTROLLO QUALITÀ' E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Il controllo positivo e negativo sono entrambi testati con il reagente di determinazione al lattice. Il controllo positivo, il controllo negativo ed il controllo anticorpo sono testati in parallelo con il reagente al lattice di controllo. Per il controllo positivo e per il controllo negativo non si ha alcuna reazione con il reagente al lattice di controllo mentre il controllo anticorpo mostra una reazione positiva.

Se i valori di controllo ottenuti non rientrano nell'ambito previsto, il test non è valido e deve essere ripetuto.
Non utilizzare un reagente al lattice non adeguatamente preparato (scaduto, congelato ecc.).

PROCEDURA DI ANALISI

Prima di iniziare il test, portare tutti i componenti a temperatura ambiente per circa 5 minuti. Si prega di proteggere tutti i reagenti dai raggi solari diretti e tenerli lontano da fonti di calore. I reagenti sono formulati come pronti all'uso e quindi non richiedono alcuna ulteriore diluizione per l'effettuazione del test. Agitare delicatamente tutti i reagenti prima dell'uso.

I controlli devono essere eseguiti una volta al giorno. Nota : non è necessario mettere un controllo su ogni cartoncino insieme al campione. Nel caso di più pazienti si suggerisce di etichettare i cartoncini, in modo da identificare i pazienti e le loro reazioni di controllo. Per l'effettuazione del controllo sono necessari 2 pozzetti per il controllo positivo, 2 pozzetti per il controllo negativo e 1 per il controllo anticorpo. Il controllo positivo e il controllo negativo sono entrambi testati con il reagente di determinazione al lattice e con il reagente di controllo al lattice, mentre il controllo anticorpo è testato solo con un reagente di controllo al lattice. Per ogni campione sono necessari 2 pozzetti, perché ogni campione deve essere testato con il reagente di determinazione al lattice e con il reagente di controllo al lattice.

1. Mantenendo il flacone del controllo positivo in posizione verticale, versare una goccia in ciascuno dei due anelli designati.
 2. Porre 25 µl del controllo anticorpo e del controllo negativo negli appositi anelli.
 3. Porre 25 µl del campione del paziente in ciascuno dei due anelli designati.
 4. Mantenendo il reagente di determinazione al lattice in posizione verticale, versare una goccia del reagente in uno degli anelli dove si trova il controllo positivo, una goccia dove si trova un controllo negativo e una goccia in un anello dove si trova il campione.
 5. Allo stesso modo aggiungere una goccia di reagente di controllo al lattice nel secondo anello dove si trova il controllo positivo, una goccia nel secondo anello dove si trova il controllo negativo e una dove si trova il controllo anticorpo ed infine una dove si trova il secondo anello con il campione.
 6. Mescolare il contenuto di ogni pozzetto usando gli appositi bastoncini, uno per ogni anello.
 7. Agitare i cartoncini dolcemente per circa 5 minuti (a mano o usando un agitatore meccanico piano).
 8. Leggere il test subito, altrimenti asciugandosi i risultati potrebbero essere errati. Si consiglia, per visualizzare meglio l'agglutinazione in ogni anello, di utilizzare una lampada incandescente ad alta intensità. Valutare i risultati su una scala da negativo a 4+.
- Riporre il reagente al lattice e il controllo positivo e negativo a 5-10°C. immediatamente dopo l'utilizzo.

VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Positivo:

Se si osserva agglutinazione delle particelle di lattice nel tempo previsto questo indica la presenza di antigeni specifici contro gli anticorpi sulle particelle di lattice. I campioni o controlli si considerano positivi.

Negativo:

Se si presenta una sospensione lattiginosa omogenea senza apparente agglutinazione dopo il tempo previsto si considera negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Singer J.M., Plotz C.M.: The Latex Fixation Test. I. Application to the Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. Am. J. Med. 21, 1956, 888-892