

**Istruzioni per l'uso BIOGNOST® ANTIGENE test**

**DFA:** Determinazione degli antigeni con IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA: Tecnica ad un solo passaggio basata su anticorpi mono o policlonali marcati FITC

**IFA:** Determinazione degli antigeni con IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA: Tecnica a due passaggi basata su anticorpi primari mono o policlonali ed anticorpi secondari marcati FITC

**PRINCIPI DELL'ANALISI**

L'analisi è basata sul metodo classico dell'immunofluorescenza. Il campione del paziente è posto, in un primo passaggio, su vetrino e sottoposto ad opportuna procedura di fissaggio (vedi sezione "raccolta e Preparazione del campione"). Viene poi ricoperto con un reagente anticorpo di opportuna specificità antigenica quindi con un coniugato fluoresceinato (DFA) oppure con un antisiero non marcato/anticorpo primario/IFA e incubato. In caso di campione positivo, gli anticorpi mono/policlonali si legheranno agli specifici antigeni bersaglio. L'eccesso di anticorpo viene successivamente lavato con il tampone a corredo.

1. DFA: si applica poi il vetrino coprioggetto.

2. IFA: durante una seconda incubazione tutti gli anticorpi primari legatisi vengono marcati FITC con l'anticorpo secondario (il coniugato). L'eccesso di coniugato è rimosso con il lavaggio del vetrino in tampone. Si applica poi il vetrino coprioggetto.

L'antigene/coniugato (DFA) oppure l'antigene/anticorpo primario/coniugato (IFA) complessi formati, visualizzati con microscopio a fluorescenza con ingrandimento a 400/500X. La sensibilità e specificità del coniugato/anticorpo primario possono essere verificati con adeguati vetrini di controllo dell'antisiero/coniugato. Non agitare durante il lavaggio dei vetrini altrimenti l'antigene fissato potrebbe essere asportato o danneggiato.

**LIMITI METODOLOGICI**

Le tecniche Biognost® per la determinazione degli antigeni in immunofluorescenza permettono la rivelazione specifica, qualitativa di patogeni tanto nel campione che nell'isolato biologico. Un risultato positivo indica un'infezione dovuta al patogeno ricercato sempreché sia stato utilizzato un vetrino per paziente. Se si ottiene più di un risultato positivo da differenti campioni sullo stesso vetrino o addirittura per differenti vetrini trattati, con gli stessi reattivi e soluzioni di lavaggio, si dovrebbe rieseguire l'esame a causa delle possibili contaminazioni crociate che possono intervenire durante le varie fasi d'analisi. In quest'ultimo caso, tutti i risultati positivi dovrebbero essere individualmente confermati. Comunque, come per altri metodi di rivelazione dell'antigene, un risultato negativo non esclude con assoluta certezza l'assenza del patogeno ricercato; vi è sempre la possibilità che l'agente infettivo non sia presente nel campione o nella porzione dello stesso utilizzata per l'analisi. Se si ottengono risultati negativi su campioni fortemente sospetti d'infezione è bene ripetere l'analisi su un campione più fresco altrimenti il risultato dovrebbe essere confermato con analisi sierologica o colturale.

**BIOGNOST® COMPONENTI DISPONIBILI**

**DFA:** coniugato specifico (poli o monoclonale, pronto all'uso o concentrato).

Vetrini di controllo, PBS, liquido di montaggio, vetrini coprioggetto; (riferirsi al listino in essere Bios)

**IFA:** anticorpo specifico (poli o monoclonale, pronto all'uso o concentrato).

Anticorpo secondario marcato FITC, vetrini di controllo, PBS, liquido di montaggio, vetrini coprioggetto; (riferirsi al listino in essere Bios)

**MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

Pipette di precisione e puntali per dispensare 1-1000 µl

Agitatore Vortex

Cilindro graduato da 500 o 1000 ml per preparare la soluzione salina di tampone fosfato

Acqua distillata o deionizzata

Camera di incubazione umidificata

Incubatore a 37 °C

Vaschette per il lavaggio dei vetrini

Bottiglia per la conservazione del tampone PBS

Cronometro

Microscopio a fluorescenza a campo scuro con filtro di eccitazione 450-490 nm e di emissione 560-590 nm (per una sensibilità ottimale, preferire un microscopio a luce incidente a uno a trasmissione). Non usare olio per immersione.

**CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

Conservare tutte le soluzioni d'anticorpo (anticorpi primari e coniugati) i vetrini di controllo alla temperatura specificata in etichetta. Per evitare l'essiccamento e la denaturazione dei vetrini di controllo, gli stessi devono essere tenuti nelle apposite buste alluminate adeguatamente sigillate. Se conservati, secondo quanto raccomandato, i controlli, coniugati e vetrini sono stabili fino alla data di scadenza in etichetta. Non usare alcun componente se scaduto. Le bustine di tampone fosfato sigillate, il liquido di montaggio ed i vetrini coprioggetto conservati alla temperatura ambiente o inferiore non hanno scadenza. Questi prodotti hanno comunque una data di scadenza in etichetta al solo scopo di facilitare un controllo di magazzino. Il tampone di lavaggio PBS (pH 7,5) dovrebbe essere preparato fresco il giorno dell'uso in quanto non contiene conservanti. Nel caso in cui rimangano avanzati di tampone e, si desidera utilizzarlo il giorno successivo alla preparazione, questo deve essere conservato adeguatamente chiuso a 5-10°C. Scartare la soluzione di tampone PBS se torbida, appare colorazione, precipitati flocculati o se il pH è cambiato.

**PRECAUZIONI PER LA SICUREZZA**

1. Tutti i campioni dei pazienti usati nelle determinazioni dell'antigene devono essere considerati come potenzialmente infetti e manipolati con l'adeguata attenzione (2,3,4); (es.: indossare il camice e guanti monouso, maschera ed occhiali protettivi, 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.).
2. Tutti i kit ed i componenti elencati nelle Istruzioni per l'uso (vedi sezione COMPONENTI) sono per uso esclusivo di diagnostica in vitro.
3. Le soluzioni d'anticorpo (anticorpi primari e coniugati) ed il liquido di montaggio, contengono 0,09% di sodio azide o altri conservanti. Tutti i conservanti sono velenosi. 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. Come specificato in etichetta, alcuni coniugati contengono blue Evans come contrastante. Il blue Evans viene considerato come possibile cancerogeno (classe 1\* secondo le tabelle di tossicità svizzere). Sebbene la concentrazione sia molto bassa (Mass. 0,2 mg/dl), gli utilizzatori devono prestare attenzione a non inalare i coniugati ed evitare ogni contatto con la pelle.
5. Si raccomanda di seguire le attuali direttive definite da "GLP" (Good Laboratory Practice).
6. Materiali e reagenti usati nell'analisi devono essere messi a rifiuto/eliminati in accordo con quanto disposto dalla legislazione vigente.

**CAMPIONI E TRATTAMENTO**

La raccolta e stabilizzazione dei campioni nonché il relativo trasporto e preparazione per l'analisi contribuiscono considerevolmente all'esito dell'analisi. È compito del laboratorio stabilire dei protocolli di manipolazione ed esecuzione prima di eseguire qualsiasi determinazione dell'antigene con i prodotti Biognost®.

Nel caso di infezioni gastrointestinali è meglio eseguire la ricerca dell'antigene in campioni di feci conservate in formalina al 10% (non è consigliata la conservazione in alcool polivinilico o con thimerosal).

In caso di infezioni alle vie respiratorie, la rivelazione specifica dell'antigene è possibile da campioni ottenuti da uno dei seguenti metodi: lavaggio broncoalveolare, biopsia broncoscopica, aspirazione transtracheale, sputo (indotto), tampone nasofaringeo o laringeo, prelievo pleurico, autopsia e coltura (test di conferma). Quando per l'analisi si usano campioni di sputo si consiglia il pretrattamento con ditio-treitolo o N-acetil cisteina per ridurre la viscosità. L'HSV è direttamente rilevabile nel fluido vescicolare. Una rivelazione valida e veritiera degli antigeni microbici intracellulari è possibile solo se il campione raccolto contiene un sufficiente numero di cellule infette. Per conservare l'infettività microbica, nel caso in cui si vogliono eseguire analisi in parallelo o per analisi di conferma mediante colture cellulari, i campioni dovranno essere immediatamente trasferiti in un opportuno terreno di conservazione dopo il prelievo dal paziente.

**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

**Fissazione ed inattivazione:**

Usare un vetrino per ogni paziente. Applicare il preparato raccolto sul vetrino e permetterne l'essiccamento a temperatura ambiente (15-30 minuti in funzione dello spessore). Notare che i campioni non ben disidratati tendono staccarsi facilmente durante le fasi di lavaggio. Una volta essiccato il preparato, dopo flambatura viene fissato (una, due o tre volte) con acetone e/o formalina. Ad evaporazione completata dei solventi, il campione è pronto per l'incubazione con l'anticorpo antigeno-specifico, che può essere l'anticorpo primario non marcato (IFA) quanto l'anticorpo coniugato con fluoresceina (DFA).

**CONTROLLO DI QUALITÀ E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI**

Includere in ogni seduta il vetrino di controllo dell'antisiero e/o coniugato. Se sul vetrino di controllo non si otterranno le reazioni attese la seduta non è convalidata e quindi dovrà essere ripetuta. Nel caso in cui il vetrino di controllo non mostri risultati adeguati verificare quanto segue:

Tutti i componenti usati siano stati forniti da Bios® (es.: vetrini coprioggetto, liquido di montaggio di altri fornitori); il tampone Biognost® sia stato preparato fresco; confermare che non ci siano problemi di efficienza e funzionamento del microscopio, come lenti degli obiettivi sporche d'olio, cattivo allineamento ottico, lampada saurita; i vetrini e tutti i componenti Biognost® siano stati conservati correttamente e che nessuno dei componenti usati fosse scaduto; la camera di incubazione fosse sufficientemente umidificata (durante tutti i passaggi dell'analisi non si deve mai permettere l'essiccazione dei pozzetti di reazione), i vetrini siano stati identificati scrivendo con pennarello ad inchiostro indelebile etc. Non forzare mai il processo di riequilibrio di temperatura dei reagenti riscaldandoli.

Ogni legame non specifico da parte del coniugato può essere identificato includendo un bianco tampone in ogni seduta/corsa; es.: dispensare, in un pozzetto di reazione un'aliquota di tampone al posto del campione ed eseguire tutto il processo secondo quanto previsto dalla metodica.

**METODICA**

I coniugati Biognost® per la tecnica di immunofluorescenza diretta, sono normalmente disponibili pronti all'uso, se non altrimenti riportato in etichetta. Una volta scongelati i coniugati pronti all'uso possono essere direttamente utilizzati per l'analisi. Alcuni coniugati vengono forniti concentrati e il rapporto di diluizione viene riportato in etichetta. Se in etichetta viene riportata la dicitura "coniugato concentrato" senza alcun altro suggerimento, l'utilizzatore dovrà determinare la diluizione ottimale di lavoro. I coniugati così diluiti non sono stabili per lungo periodo e perciò vanno preparati freschi ad ogni seduta.

Gli anticorpi Biognost® primari e secondari sono normalmente pronti all'uso se non diversamente riportato in etichetta

**I. Determinazioni in Immunofluorescenza diretta (DFA):**

1. Applicare sul vetrino di lavoro un volume sufficiente (una o più gocce) di coniugato pronto all'uso o opportunamente diluito in modo da coprire completamente il campione.
2. Incubare i vetrini in camera umida: 30 minuti a temperatura ambiente o a 37 °C. Proteggere dalla luce solare diretta; tenere lontani da sorgenti riscaldanti.
3. Rimuovere i vetrini dalla camera umida, scartare l'eccesso di liquido e lavare accuratamente gli stessi con tampone fosfato. (Non spruzzare il tampone direttamente sui pozzetti di reazione!)
4. Immergere i vetrini in PBS e lavare 2 x 5 minuti, usare una vaschetta di decolorazione adeguatamente grande e cambiare il tampone fra i lavaggi. Non agitare quando i vetrini sono immersi nel tampone.
5. Asciugare brevemente i vetrini con gli appositi cartoncini assorbenti. Il substrato non deve seccare. Procedere perciò passando immediatamente al punto 6.
6. Montare i vetrini coprioggetto mettendo 2-3 gocce di liquido di montaggio per ogni vetrino e, per evitare l'intrappolamento di bolle d'aria, accuratamente abbassare il coprioggetto da un lato all'altro del vetrino. Osservare e valutare i pozzetti di reazione con un microscopio a fluorescenza, per ottenere i migliori risultati questo dovrebbe essere fatto immediatamente. I vetrini possono essere conservati per 24 ore se tenuti al buio e refrigerati evitandone l'essiccamento.

**II. Determinazioni in Immunofluorescenza indiretta (IFA):**

1. Applicare sul vetrino di lavoro un volume sufficiente (una o più gocce) di anticorpo primario in modo da coprire completamente il campione.
2. Incubare i vetrini in camera umida: 30 minuti a temperatura ambiente o a 37 °C. Proteggere dalla luce solare diretta; tenere lontani da sorgenti riscaldanti.
3. Rimuovere i vetrini dalla camera umida, scartare l'eccesso di liquido e lavare accuratamente gli stessi con tampone fosfato. (Non spruzzare il tampone direttamente sui pozzetti di reazione!)
4. Immergere i vetrini in PBS e lavare 2 x 5 minuti, usare una vaschetta di decolorazione adeguatamente grande e cambiare il tampone fra i lavaggi. Non agitare quando i vetrini sono immersi nel tampone.
5. Asciugare brevemente i vetrini con gli appositi cartoncini assorbenti. Il substrato non deve seccare. Procedere perciò passando immediatamente al punto 6.
6. Applicare l'adeguato coniugato (anticorpo secondario marcato FITC) sui pozzetti come indicato al punto 1.
7. Incubare i vetrini in camera umida: 30 minuti a temperatura ambiente. Proteggere dalla luce solare diretta; tenere lontani da sorgenti riscaldanti.
8. ripetere i punti da 3 a 5
9. Montare i vetrini coprioggetto mettendo 2-3 gocce di liquido di montaggio per ogni vetrino e, per evitare l'intrappolamento di bolle d'aria, accuratamente abbassare il coprioggetto da un lato all'altro del vetrino. Osservare e valutare i pozzetti di reazione con un microscopio a fluorescenza, per ottenere i migliori risultati questo dovrebbe essere fatto immediatamente. I vetrini possono essere conservati per 24 ore se tenuti al buio e refrigerati evitandone l'essiccamento.

**VALUTAZIONE DEI VETRINI E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

I vetrini devono essere osservati con un microscopio a fluorescenza a campo scuro ( filtro 450-490 nm) con ingrandimento da 400X a 500x (sopravisione con ingrandimento a 100X). Per evitare la perdita di sensibilità, dovuta a foto scolorimento, non rimanere sullo stesso campo di visione più del tempo strettamente necessario alla valutazione. Per risultati ottimali, osservare il maggiore numero di campi possibile in rapida successione.

Leggere i vetrini immediatamente; se impossibile, conservare gli stessi al buio, refrigerati e protetti contro l'essiccamento. Per una lunga conservazione (es.: per un uso didattico) i vetrini devono essere sigillati lungo i bordi e posti a -20 °C.

**Quadro fluoroscopico (patterns):**

Per valutare i risultati d'analisi deve essere esclusivamente presa in considerazione la colorazione delle caratteristiche strutture.

**Positivo:**

La fluorescenza specifica ha il tipico colore verde-mela con intensità variante comunemente classificata su una scala da 1+ (debole), 2+ (moderata), 3+ (forte/brillante) a 4+ molto forte/brillante.

Un campione viene considerato positivo per il patogeno ricercato se si potrà osservare una fluorescenza delle strutture tipiche valutata almeno 1+.

**Negativo:**

Una fluorescenza classificata inferiore a 1+ è considerata come risultato negativo

Ogni autofluorescenza giallastra o verde scuro è aspecifica e non considerata.

**Antigeni e strutture bersaglio:**

Gli anticorpi Biognost® riconoscono specificatamente le strutture antigeniche caratteristiche del patogeno ricercato (batteri, CPE etc.). Se al microscopio a fluorescenza si ha chiaramente visibile il tipico colore verde-mela in una qualsiasi delle strutture patogene il campione esaminato è positivo altrimenti, la presenza di una sola struttura patogena è sufficiente prova che il paziente è infettato dal patogeno ricercato.

Si ricorda comunque agli utilizzatori che i singoli risultati dovrebbero essere sempre interpretati nel contesto delle relative informazioni generali disponibili sul paziente (es.: sintomi e segni clinici, tempo dal prelievo, altri risultati di laboratorio).

**REFERENCES**

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

**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