

Fiche technique BIOSAVE® Détection des ANTIGENES

Détection des agents pathogènes humains par AGGLUTINATION DES PARTICULES DE LATEX dans les sérums humains, les liquides céphalorachidiens et les selles

Durée du test: environ 7 minutes jusqu'à 25 minutes maxi (traitement à la pronase)

EMPLOI DU TEST CONFORMEMENT AUX INSTRUCTIONS

Le test Biosave® pour la Détection des Antigènes est un test rapide d'agglutination des particules de latex pour la détection qualitative des antigènes dans les sérums humains, les liquides céphalorachidiens et les selles. Le test Biosave® pour la Détection des Antigènes est destiné au diagnostic in vitro.

PRINCIPE DU TEST

Le test s'appuie sur la méthode de l'agglutination au latex (agglutination indirecte). Les particules de latex sont recouvertes des anticorps (provenant du lapin) dirigés contre l'antigène en question. Les particules de latex recouvertes des anticorps se trouvent dans une suspension stabilisée. Le réactif de détection latex et l'échantillon du patient sont mélangés dans une zone de dépôt de la carte ou plaque d'agglutination. Si l'échantillon contient l'antigène recherché, cet antigène réagit avec les anticorps immobilisés sur les particules de latex de manière qu'une agglutination visible à l'œil nu se produit pendant le temps de réaction déterminé. Si l'échantillon ne contient pas d'antigènes spécifiques, aucune agglutination peut être observée et la mixture de réaction reste trouble et de couleur laiteuse.

Des réactions non-spécifiques (p. ex. à cause de la présence des facteurs rhumatoïdes) peuvent être démontrées par une analyse parallèle de l'échantillon lors de laquelle un réactif de contrôle latex recouvert des immunoglobulines normales de lapin est utilisé. Dans la plupart des cas, les réactions non-spécifiques se produisent à cause de la présence des protéines qui peuvent être détruites à l'aide de l'enzyme pronase. Aux cas où l'antigène recherché ne se compose pas de protéines, un prétraitement de l'échantillon à la pronase peut donc augmenter la spécificité du test. Une autre méthode (qui convient à tous les tests!) pour éliminer des facteurs rhumatoïdes perturbants consiste en le prétraitement de l'échantillon par notre réactif Biosorb® (immunoglobulines anti-humaines).

LIMITES DE LA METHODE

Les tests d'agglutination au latex Biosave® pour la Détection des Antigènes conviennent à la détection qualitative de l'antigène en question. Comme chez tous les tests destinés à la recherche des antigènes, un résultat négatif ne signifie pas obligatoirement que le patient ne soit pas infecté par le pathogène recherché. Emettre un diagnostic d'après un seul test est délicat, et l'on doit toujours considérer le contexte clinique du patient (symptômes, date du prélèvement de l'échantillon, d'autres résultats de laboratoire et donnés connus du patient, etc). De plus, pour confirmer les résultats négatifs ou incertains, il est recommandé de répéter le test au bout de 10-14 jours en utilisant un prélèvement frais.

REACTIFS BIOSAVE®

Réactif de détection latex: Suspension stabilisée aux particules de latex recouvertes des anticorps de lapin dirigés contre l'antigène en question; prêt à l'emploi; dans un flacon compte-gouttes.

Réactif de contrôle latex: Suspension stabilisée aux particules de latex recouvertes des immunoglobulines normales de lapin; prêt à l'emploi; dans un flacon compte-gouttes.

Témoin anticorps: Sérum anti-Ac du lapin (provenant de la chèvre); lyophilisé.

Témoin positif: Extrait d'antigènes stabilisé; prêt à l'emploi; dans un flacon compte-gouttes.

Témoin négatif: Sérum humain stabilisé, sans anticorps agglutinants; lyophilisé.

Pronase: Pour le prétraitement des échantillons de sérum; lyophilisé.

Tampon de dilution: Pour diluer les échantillons; prêt à l'emploi.

Cartes ou plaques d'agglutination jetables ou plaque d'agglutination réutilisable.

Fiche technique.

MATERIELS ET EQUIPEMENTS AUXILIAIRES QUI NE SONT PAS FOURNIS

Pipettes pour l'application des échantillons

Spatules en plastique

Agitateur mécanique (si disponible)

Chronomètre

Lampe à tube luminescent (si disponible)

STOCKAGE ET CONSERVATION

Si le réactif de détection latex Biosave® et les témoins Biosave® sont stockés à 5-10°C, ils se conservent jusqu'à la date de péremption figurant sur l'emballage.

N'utilisez jamais de réactifs péremptés! Attention: Le réactif de détection latex ne doit en aucun cas être congelé, autrement un agglomérat inutilisable sera obtenu! La conservation de la plaque d'agglutination n'est pas limitée dans le temps.

INSTRUCTIONS DE SECURITE

1. Le témoin positif contient un extrait d'antigène et doit être considéré comme risque potentiel d'infection. Pour cette raison, sa manipulation nécessite de prendre les précautions appropriées.
2. Tous les sérums humains qui ont été utilisés à la préparation des réactifs à base de sérums humains (témoins) ont fait l'objet d'une recherche d'antigènes HBs et d'anticorps dirigés contre le virus HIV dont le résultat s'est avéré négatif. Toutefois, dans la mesure où un caractère infectieux ne peut jamais être exclu à 100 %, leur manipulation nécessite de prendre les précautions appropriées.
3. Selon les indications sur les étiquettes, tous les réactifs liquides (réactif de détection latex, tampons, etc.) contiennent azide de sodium ou thimérosal comme conservateurs. Le thimérosal et l'azide de sodium sont toxiques. Evitez l'inhalation, l'avalement ainsi que tout contact avec les yeux et la peau! Lors du contact avec la peau, rincez abondamment à l'eau. A cause du danger de la formation de substances explosives, les réactifs contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être mis en contact avec des objets qui contiennent du cuivre et ou du plomb.
4. Les consignes de sécurité de la caisse de prévoyance des accidents au travail ainsi que des laboratoires des instituts en question concernant les substances toxiques, irritantes et de danger biologique sont à respecter strictement (voir les affiches, le journal du laboratoire, les instructions de sécurité ainsi que les consignes résultant de l'accréditation de l'établissement).
5. Il est recommandé de respecter les directives actuelles définies par „GBEA“ (Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale).
6. Tous les sérums et matériels utilisés dans le test doivent être éliminés selon la législation en vigueur.

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Le test convient à l'analyse d'échantillons de sérum ou de liquide céphalorachidien. A 5-10° C le sérum ou le liquide céphalorachidien se conservent une semaine environ. Pour permettre un stockage plus long ou des analyses répétées, tous les échantillons devront être congelés à ≤ -20° C.

Les échantillons de sérum :

Pour une plus grande spécificité du test, il est conseillé de prétraiter les échantillons de sérum à la pronase. Attention: Veillez à ce que les échantillons ne contiennent pas de substances anticoagulants car ceux-ci peuvent perturber le test!

1. Mélanger 200 µl de sérum et 200 µl de solution de pronase dans une éprouvette et bien fermer le récipient.

2. Laisser incuber la mixture sérum/pronase 15 min à 56° C.

3. Faire immédiatement bouillir la mixture 5 min pour terminer la réaction enzymatique.

4. La mixture sérum/pronase peut être utilisée à la préparation du test dès qu'elle s'est refroidie à température ambiante. Après ce prétraitement à la pronase, les échantillons sont déjà dilués 1:2. En faisant le titrage, il faut tenir compte de cette dilution.

Les échantillons de liquide céphalorachidien :

Les échantillons de liquide céphalorachidien doivent être inactivés pour éviter des réactions non-spécifiques. Avant le dépistage, il est donc nécessaire de les incuber 5 min dans de l'eau bouillante.

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs lyophilisés sont à solubiliser dans les volumes d'eau distillée ou déminéralisée indiqués sur les étiquettes. La reconstitution des réactifs ne doit pas être accélérée par réchauffement ou agitation vigoureuse.

Avant chaque utilisation, inactiver par la chaleur le **contrôle négatif** à 56°C pendant 30 minutes.

CONTROLE DE LA QUALITE ET SOURCES DE PERTURBATIONS

Le témoin positif et le témoin négatif sont vérifiés par le réactif de détection latex ainsi que par le réactif de contrôle latex; le témoin anticorps n'est analysé que par le réactif de contrôle latex.

Si les témoins ne fournissent pas les résultats escomptés, le test n'est pas valable et doit être répété.

Si le réactif de détection latex contient des agglomérats (à cause du dépassement de la date de péremption, suite à un dessèchement ou une congélation), il ne doit plus être utilisé à la préparation du test. N'utilisez que des plaques d'agglutination réutilisables en état propre et exemptes de peluches et de résidus de réactifs!

MODE OPERATOIRE

Tous les réactifs du test sont prêts à l'emploi dès qu'ils ont atteint la température ambiante (après 5 minutes environ). Ne jamais accélérer le processus de chauffage en utilisant des sources de chaleur (comme par exemple des rayons directs de soleil ou la proximité des radiateurs). Les réactifs et les sérums s'utilisent sans dilution préalable. Agiter avec précaution tous les réactifs avant l'emploi.

Sur les plaques d'agglutination, les zones de dépôt (puits) prévues pour les échantillons et les différents contrôles sont prémarquées ou doivent être annotées.

1. Appliquer une goutte du témoin positif sur toutes les zones de dépôt prévues à cet effet. Pour ce faire, tenir le flacon compte-gouttes à la verticale afin d'obtenir une goutte de taille requise.

2. Distribuer une goutte distincte (ou 25 µl) du témoin négatif et du témoin anticorps sur les zones de dépôt correspondantes.

3. Distribuer 25 µl des échantillons de patient sur les zones de dépôt correspondantes.

4. Ajouter une goutte du réactif de détection latex sur un puits du témoin positif, sur un puits du témoin négatif et sur un puits des échantillons.

5. Appliquer de la même manière une goutte du réactif de contrôle latex sur le puits du témoin positif, du témoin négatif et du témoin anticorps et des échantillons.

6. Mélanger soigneusement le contenu de chaque puits. Utiliser une spatule différente pour chaque échantillon et chaque témoin.

7. Agiter la plaque avec précaution à la main ou sur un agitateur mécanique (125 ± 25 rpm) pendant 5 min environ à température ambiante.

8. Procéder à la lecture de l'agglutination immédiatement après l'incubation pour éviter que les puits se dessèchent et, par conséquent, risquent de fournir des résultats incorrects. Il est recommandé d'évaluer le test sous une lampe à tube fluorescent.

Restocker les réactifs au réfrigérateur immédiatement après l'usage.

INTERPRETATION

Positif:

Si une agglutination du témoin ou des échantillons de patients s'observe pendant le temps déterminé, la présence des antigènes spécifiques dirigés contre les anticorps fixés sur les particules de latex est démontrée. Le test est alors positif.

Le prétraitement du témoin positif est adapté à la sensibilité du test de manière qu'elle montre une agglutination nette pendant le temps de réaction déterminé.

Négatif:

Lorsque, pendant le temps d'incubation défini pour l'analyse, la suspension ne change pas son aspect homogène et de couleur laiteuse, le témoin et les sérums de patient sont considérés comme négatifs.

BIBLIOGRAPHIE

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