

**Fiche Technique BIOGNOST® ANTIGENE**

**IFD** : DETECTION DES AG par IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE : Technique à une seule étape à l'aide des anticorps mono-/polyclonaux marqués FITC

**IFI** : DETECTION DES AG par IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE : Technique à deux étapes à l'aide des anticorps primaires mono-/polyclonaux et des anticorps secondaires marqués FITC

**EMPLOI DU TEST CONFORMEMENT AUX INSTRUCTIONS**

Le test d'IFD Biognost® Antigène est un test d'immunofluorescence directe, le test d'IFI Biognost® Antigène est un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection qualitative des antigènes microbiens, soit directement à partir des échantillons de patient, soit dans des isolats microbiens. Les tests d'IFI Biognost® Antigène sont destinés au diagnostic in vitro.

**PRINCIPE DU TEST**

Le test s'appuie sur la méthode classique de l'immunofluorescence. Dans une première étape, les échantillons de patient sont fixés sur une lame (voir passage „TRAITEMENT DES ECHANTILLONS“) et incubés avec le conjugué ou l'antisérum/l'anticorps primaire. Lors de cette étape, les anticorps mono- ou polyclonaux se lient de manière spécifique aux pathogènes présents dans les échantillons de patient positifs. Pour éliminer l'excès des anticorps, la lame sera lavée. Pour les tests d'IFD, la lame sera ensuite couverte de milieu de montage et d'une lamelle. Pour les tests d'IFI, une deuxième étape d'incubation suit pendant laquelle les anticorps primaires liés au substrat font l'objet d'un marquage optique par l'anticorps secondaire marqué FITC (le conjugué). Pour éliminer l'excès du conjugué, la lame sera de nouveau lavée. Ensuite, elle sera couverte de milieu de montage et d'une lamelle. Les complexes antigène/conjugué (tests d'IFD) ou antigène/anticorps primaire/conjugué (tests d'IFI) peuvent alors être examinés au microscope à fluorescence au grossissement 400-500.

**LIMITES DE LA METHODE**

Les tests d'immunofluorescence Biognost® pour la recherche des antigènes microbiens permettent une détection spécifique et qualitative des pathogènes, soit directement à partir des échantillons de patient, soit dans des isolats microbiens. Les résultats positifs de ces tests peuvent être considérés comme preuve des infections aux germes recherchés pourvu que les échantillons provenant de différents patients soient analysés sur des lames individuelles. Au cas où l'on obtient plusieurs résultats positifs lors de l'examen de plusieurs échantillons de différents patients sur une seule lame (ou sur plusieurs lames qui sont trempées dans le/s même/s bain/s de tampon PBS), il faut considérer ces résultats d'un œil critique: Comme, dans ces cas, on ne peut pas exclure à 100% des contaminations des puits négatifs par des puits aux échantillons positifs, il est conseillé de confirmer de tels résultats indépendamment (en déposant les échantillons de différents patients sur des lames individuelles qui seront lavées dans des cuvettes de lavage individuelles). 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. Ceci veut uniquement indiquer que le matériau prélevé du patient ou l'échantillon qui en a été préparé ne contient pas le germe en question. Aux cas où une infection du patient au pathogène recherché semble malgré tout très vraisemblable, il est donc recommandé de répéter le test (de préférence avec un prélèvement frais) ou – selon le caractère du pathogène – de confirmer le résultat par des tests d'immuno-sérologiques ou des cultures microbiennes.

**PRODUITS BIOGNOST® DISPONIBLES POUR LA RECHERCHE DES ANTIGENES MICROBIENS**

**IFD**: Conjugué spécifique au pathogène recherché (poly- ou monoclonal, prêt à l'emploi ou concentré), lames de contrôle, tampon PBS, milieu de montage, lamelles; voir catalogue actuel Bios®.

**IFI**: Anticorps spécifique au pathogène recherché (poly- ou monoclonal, prêt à l'emploi ou concentré), anticorps secondaire marqué FITC, lames de contrôle, tampon PBS, milieu de montage, lamelles; voir catalogue actuel Bios®.

**MATERIELS ET EQUIPEMENTS AUXILIAIRES QUI NE SONT PAS FOURNIS**

Pipettes de précision (intervalle 1-1000 µl)

Agitateur type „Vortex“

Récipient gradué (500 ou 1000 ml) pour la préparation du tampon PBS

Eau distillée ou déminéralisée

Chambre humide d'incubation

Etuve (37° C) si disponible

Cuvettes de lavage pour les lames (aussi grandes que possible)

Bouteille de polyéthylène à pissette pour le tampon PBS

Chronomètre

Microscope à fluorescence fond noir au filtres permettant une excitation de 450-490 nm et une émission de 560-590 nm (A utiliser sans huile d'immersion!). Pour une sensibilité maximale, utiliser de préférence un épimicroscope plutôt qu'un microscope de translucidance.

**STOCKAGE ET CONSERVATION**

Les solutions aux anticorps (anticorps primaires et conjugués) ainsi que les lames de contrôle se conservent exclusivement à la température indiquée sur l'étiquette (5-10°C ou ≤ -20°C). Pour éviter le dessèchement et la dénaturation des substrats, les lames doivent, par ailleurs, être conservées dans les pochettes d'aluminium bien fermées et imperméables à l'air. Si les recommandations indiquées sur les étiquettes sont bien respectées, ces réactifs se conservent jusqu'à la date de péremption figurant sur l'emballage. N'utilisez jamais de réactifs périmés! La conservation du tampon PBS en poudre n'est pas limitée dans le temps à condition qu'il soit gardé dans des pochettes imperméables à l'air et à température ambiante ou une température inférieure. Le milieu de montage, les pochoirs absorbants et les lamelles se conservent également sans limites si leur stockage à température ambiante ou une température inférieure est garanti. Comme le tampon PBS ne contient pas de conservateur, il est conseillé d'utiliser les solutions de tampon PBS (pH 7,5) le jour même de leur préparation. Pour une utilisation le lendemain, elles seront entretemps gardées à 5-10°C dans un récipient bien fermé. Toute solution PBS à l'état trouble, floconné, coloré ou dont le pH est modifié doit être rejetée.

**INSTRUCTIONS DE SECURITE**

1. Toutes les matériaux d'échantillon des patients constituent un risque potentiel d'infection. Pour cette raison, leur manipulation nécessite de prendre les précautions appropriées comme par exemple la porte des gants, d'un masque buccal et des lunettes protectrices. Respectez les consignes de sécurité internes de votre laboratoire.
2. Tous les kits et réactifs Biognost® pour la recherche d'antigènes sont exclusivement destinés au diagnostic in vitro.
3. Les solutions aux anticorps (anticorps primaires et conjugués) et le milieu de montage contiennent 0,09 % d'azide de sodium ou autres agents microbicides. L'azide de sodium et tous les autres conservateurs utilisés sont toxiques. Evitez l'avalé ainsi que tout contact avec la peau et les muqueuses! De plus, à 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. Le bleu d'Evans est potentiellement cancérigène et représente une toxine de la classe 1\* selon la classification suisse des substances toxiques. En utilisant des solutions au bleu d'Evans, il est donc conseillé d'éviter l'avalé ainsi que tout contact avec la peau.
5. 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).
6. Il est recommandé de respecter les directives actuelles définies par „GBEA“ (Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale).
7. Tous les sérums et matériels utilisés dans le test doivent être éliminés selon la législation en vigueur.

**TRAITEMENT DES ECHANTILLONS**

La fiabilité des résultats des tests est essentiellement caractérisée par (entre autres) le prélèvement, la stabilisation et le transport des échantillons ainsi que par leur traitement lors de la préparation de l'analyse médicale. Avant l'utilisation de nos réactifs, il est alors conseillé à l'utilisateur d'établir le procédé de la détection des

**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

antigènes dans son laboratoire. Aux cas où une analyse complémentaire des échantillons à l'aide des cultures microbiennes est prévue (par exemple pour confirmer un résultat), il faut transférer le matériel du patient dans un milieu de transport approprié, ceci immédiatement après le prélèvement. En diagnostic des maladies gastrointestinales, les pathogènes sont recherchés à partir des selles. Tous les échantillons conservés par exemple dans de la formaline à 10 % conviennent aux tests. Par contre, l'alcool polyvinyle et le merthiolate/formaldéhyde iodé ne doivent pas être utilisés comme agents de conservation. Pour la recherche des pathogènes respiratoires, on peut principalement utiliser tous les échantillons prélevés par lavage bronchoalvéolaire, biopsie bronchoscopique, aspiration transtrachéale, crachat (induit), frottis nasopharyngien, ponction de la plèvre, autopsie et culture microbienne (test de confirmation de culture). Lors de l'examen de crachat, il est souvent utile de réduire la viscosité des échantillons à l'aide d'un prétraitement par du dithiothréitol ou de la N-acétyl-cystéine. Le virus VHS se détecte facilement à partir des liquides de vésicules cutanées ou des frottis vésiculaires. Une détection fiable des antigènes microbiens intracellulaires n'est assurée que si les échantillons du patient contiennent des cellules complètes (contenant de l'antigène) en des quantités suffisantes.

#### Fixation/Inactivation:

Appliquer les échantillons prétraités sur les lames et les laisser sécher entièrement à l'air libre à température ambiante (15 - 30 min). Utiliser des lames individuelles pour les échantillons de différents patients! Attention: Lors d'un séchage incomplet des échantillons, les matériaux des patients risquent d'être relavés lors des étapes de lavage! Ensuite, les lames doivent faire l'objet d'une fixation à la chaleur et/ou à l'acétone et/ou à la formaline (simple, double ou triple fixation). Après l'évaporation de toutes traces de solvants, les échantillons peuvent être soumis à l'incubation avec l'anticorps ou le conjugué spécifiques de l'antigène recherché.

#### CONTROLE DE LA QUALITE ET SOURCES DE PERTURBATIONS

Afin de contrôler l'activité et la spécificité de l'antisérum et/ou du conjugué utilisé, une lame de contrôle aux témoins négatif et positif doit être également préparée lors de chaque test. Si cette lame ne fournit pas les résultats escomptés, le test n'est pas valable et doit être répété. Si, dans le laboratoire de l'utilisateur, la lame de contrôle ne fournit pas de résultats impeccables, il est à vérifier, si exclusivement des réactifs Biognost® (ou par exemple des lamelles ou du milieu de montage d'un autre fournisseur) ont été utilisés à la préparation du test. Assurez-vous aussi que la solution de tampon PBS Biognost® a été fraîchement préparée et contrôlez que le microscope à fluorescence est en ordre parfait (des sources possibles de perturbation consistent par exemple en des objectifs salis d'huile ou en une lampe trop faible ou mal ajustée). Par ailleurs, vérifiez, si toutes les recommandations de stockage des réactifs étaient bien respectées, si des composants déjà préemptés ont été utilisés et si la chambre d'incubation était suffisamment humide pendant toute la durée du test. Vérifiez également, si les lames étaient faussement inscrites par un stylo feutre (au lieu d'un crayon à mine dure) etc. Avant de préparer les tests, évitez en tout cas d'accélérer le processus de chauffage des réactifs en utilisant des sources de chaleur! Pour éviter que les antigènes fixés sur les lames ne soient altérés ou ne se détachent des lames, il est absolument déconseillé de remuer le tampon lors du lavage.

#### MODE OPERATOIRE

Les conjugués Biognost® pour les tests d'immunofluorescence directe sont disponibles sous forme prête à l'emploi et/ou comme solution „stock“ (d'une concentration caractérisée). En outre, certains de ces conjugués sont également disponibles comme des solutions concentrées. Les solutions fournies prêtes à l'emploi peuvent être utilisées à la préparation des tests immédiatement après décongélation et/ou réchauffement à température ambiante. Les solutions stock doivent être diluées selon les indications sur les étiquettes. L'utilisation des solutions concentrées permet à chaque utilisateur de déterminer la concentration la mieux adaptée aux besoins de son laboratoire. Pourtant, comme les conjugués dilués ne se conservent pas pendant des périodes prolongées, des dilutions fraîches sont à préparer lors de chaque préparation des tests. Ces instructions sont également valables pour les tests d'immunofluorescence indirecte, c.-à-d. les anticorps primaires Biognost® ainsi que les anticorps secondaires Biognost® (les conjugués) peuvent également être fournis comme réactifs prêts à l'emploi/„stock“/concentrés et doivent, le cas échéant, être prédilués.

#### I. Mode opératoire des tests d'immunofluorescence directe (tests d'IFD):

1. Distribuer une ou plusieurs gouttes du conjugué prêt à l'emploi ou dûment prédilué sur la lame de telle sorte que le matériel fixé du patient soit complètement couvert de liquide.
2. Laisser incuber les lames 30 minutes à température ambiante ou à 37° C (pour les pathogènes intracellulaires) en chambre humide. Mettre la chambre d'incubation à l'abri de la lumière et éviter la proximité de sources de chaleur.
3. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer avec précaution à l'aide d'une bouteille à pissette remplie de PBS (ne jamais diriger le jet de la pissette directement sur les puits!).
4. Laisser tremper les lames 2x 5 minutes dans un bain de tampon PBS qui sera changé la deuxième fois; utiliser de grandes cuvettes de lavage et éviter d'agiter et de remuer le tampon lors du lavage. Utilisez des cuvettes de lavage individuelles pour chaque lame!
5. Sortir les lames et les essuyer bien avec du papier absorbant tout autour des zones de dépôt des échantillons. L'antigène ne doit en aucun cas sécher. Il faut donc:
6. Distribuer immédiatement 2 à 3 petites gouttes de milieu de montage sur chaque lame et déposer les lamelles sur les lames en évitant la formation de bulles d'air. Procéder immédiatement à l'examen des préparations au microscope à fluorescence ou les garder au frais et dans l'obscurité pour les examiner exceptionnellement dans les deux heures suivantes. Si nécessaire, enlever des traces excédentaires de milieu de montage afin d'éviter que les lames collent au plateau du microscope ou au récipient où elles seront stockées.

#### II. Mode opératoire des tests d'immunofluorescence indirecte (tests d'IFI):

1. Distribuer une ou plusieurs gouttes de l'anticorps primaire prêt à l'emploi ou dûment prédilué sur la lame de telle sorte que le matériel fixé du patient soit complètement couvert de liquide.
2. Laisser incuber les lames 30 minutes à température ambiante ou à 37° C (pour les pathogènes intracellulaires) en chambre humide. Tenir les lames à l'abri des rayons directs de soleil et éviter la proximité de sources de chaleur.
3. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer avec précaution à l'aide d'une bouteille à pissette remplie de PBS (ne jamais diriger le jet de la pissette directement sur les puits!).
4. Laisser tremper les lames 2x 5 minutes dans un bain de tampon PBS qui sera changé la deuxième fois; utiliser de grandes cuvettes de lavage et éviter d'agiter et de remuer le tampon lors du lavage. Utilisez des cuvettes de lavage individuelles pour chaque lame.
5. Sortir les lames et les essuyer bien avec du papier absorbant tout autour des zones de dépôt des échantillons. L'antigène ne doit en aucun cas sécher. Il faut donc:
6. Distribuer au plus vite le conjugué approprié (anticorps secondaires marqués FITC) sur les lames comme il est décrit sous 1.
7. Laisser incuber les lames 30 minutes à température ambiante ou à 37° C (pour les pathogènes intracellulaires). en chambre humide. Mettre la chambre d'incubation à l'abri de la lumière et éviter la proximité de sources de chaleur.
8. Répéter les étapes 3. à 5.
9. Voir étape I. 6.

#### INTERPRETATION

Les préparations seront examinées au microscope à fluorescence au grossissement 400-500 (bande d'excitation des filtres 450-490 nm). Pour éviter la décoloration des préparations et obtenir des résultats fiables, examiner rapidement autant de champs visuels que possible et renoncer à examiner les champs visuels particuliers plus longtemps que ce que leur interprétation habituelle l'exige.

Les tests fournissent les meilleurs résultats, si l'on procède à l'examen des préparations au microscope immédiatement après la préparation des lames. Si cela n'est pas possible, les lames doivent alors être gardées au frais et dans l'obscurité dans des classeurs à lames de telle manière qu'elles soient protégées contre le dessèchement. L'interprétation du test exige que les témoins analysés avec les échantillons fournissent les résultats escomptés.

#### Motifs de fluorescence:

Pour évaluer les tests, seulement la fluorescence spécifique des structures microbiennes caractéristiques des antigènes recherchés doit être considérée.

#### Positif:

La fluorescence spécifique se présente sous forme d'une coloration vert clair d'une intensité variable notée comme suit: 1+ (faible), 2+ (moyenne), 3+ (forte), 4+ (brillante).

**Négatif:** Toutes fluorescences d'une intensité inférieure à 1+ sont considérées comme négatives. Les colorations jaunâtres où vert foncé doivent être ignorées, car elles sont le résultat des réactions non-spécifiques.

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

**Structures des antigènes cibles:**

Si une fluorescence vert pomme clair ( $\geq 1+$ ) d'une ou de plusieurs structures microbiennes caractéristiques des pathogènes recherchés (bactéries, ECP, etc.) s'observe au microscope à fluorescence, l'échantillon examiné est considéré comme positif et démontre une infection du patient au germe recherché .

**BIBLIOGRAPHIE**

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