

GEBRAUCHSANLEITUNG

Babesia microti IFA IgG Antikörper Kit

Bestellnummer:	BMG-120
Format:	120 Tests
Aufbewahrung	2-8°C

Ein indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis humaner IgG Antikörper gegen *Babesia microti*

***In-vitro*-Diagnostikum**



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 USA
Phone: +1-714-525-7660
Fax +1-714-525-7614
E-Mail: info@fullerlabs.com
URL: www.fullerlabs.com



MediMark Europe Sarl
11, rue Émile Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 – Frankreich

VERWENDUNGSZWECK

Der *Babesia microti* Immunfluoreszenz-Antikörper (IFA) IgG Test ist zum semi-quantitativen Nachweis humaner IgG- Antikörper gegen *Babesia microti* und als *in vitro Test* zur Unterstützung bei der Diagnose von Babesiose bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Babesiose in Nordamerika wird durch das Protozoan *Babesia microti* verursacht. Sie wird durch den Biss infizierter Zecken übertragen und es ist bekannt, daß Babesiose mit *Anaplasma phagocytophila* (HGE) und/oder *Borrelia burgdorferi* zusammen übertragen werden kann. Bei der anschließenden Infektion kommt es zu einer spezifischen Antikörperreaktion, die nachgewiesen und als indirektes Mittel zur Identifizierung von infizierten Personen genutzt werden kann. Der IFA Test verwendet *Babesia microti* infizierte Hamster- oder Mäuseerythrozyten als Substrat für den spezifischen Antikörpernachweis.

Verdünnungen des Patientenserums werden auf Testfelder, beschichtet mit *Babesia microti* infizierten Hamster- oder Mäuseerythrozyten, pipettiert und inkubiert. Danach werden ungebundene Serumbestandteile durch Waschen entfernt und die spezifische Reaktion durch Anfärbung mit Immunglobulin klassenspezifischem DyLight 488 Konjugat nachgewiesen. Die resultierenden Reaktionen werden mit der Standardfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Eine positive Reaktion zeigt eine scharf abgegrenzte apfelgrüne Fluoreszenz der Einschlusskörper in den Erythrozyten. Eine negative Reaktion zeigt keine Fluoreszenz oder die Fluoreszenz zeigt ein anderes Muster als die der positiven Kontrolle. Positive Proben können zur Bestimmung des Endtiters weiter verdünnt und nochmals getestet werden.

INHALT DES TESTBESTECKS

IFA Ag x 12

Substratobjektträger (10)

Zehn Objektträger mit jeweils zwölf Testfeldern, mit Acetonfixierten Hamster- oder Mäuseerythrozyten, infiziert mit *Babesia microti* und unter Vakuum verpackt.

CONJ FITC

IgG Konjugat, 2.5 ml

Tropfflasche mit gelbem Verschluss enthält Anti-Human-IgG-DyLight 488 Konjugat in proteinhaltiger Pufferlösung, mit Evans Blau als Gegenfärbung.

CONT +

Positive Kontrolle, 0.5 ml

Tropfflasche mit blauem Verschluss enthält reaktives gebrauchsfertiges Humanserum, 1:64 vorverdünnt.

CONT -

Negative Kontrolle, 0.5 ml

Tropfflasche mit rotem Verschluss enthält nichtreaktives Humanserum, 1:50 vorverdünnt.

MM

Eindeckmedium, 1 ml

Tropfflasche enthält 50% Glycerin in PBS

BUF WASH PBS

PBS, Pulver für 1 Liter

Auflösen des Pulvers in 1 l destilliertem Wasser ergibt 1 l PBS pH 7,2.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Objektträger sind mit chemisch inaktivierten Antigenen hergestellt. Die Objektträgern sollten dennoch wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Dieser Kit ist lediglich zum in-vitro-Gebrauch bestimmt.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Thimerosal, deshalb ist ein Verschlucken und Berühren mit der Haut zu vermeiden.
- Benutzen Sie keine Kitbestandteile nach Ablauf der Verfallsdaten.
- Konjugat ist lichtempfindlich, es ist in ein Licht- undurchlässiges Plastikgefäß abgefüllt. Nach Gebrauch wieder dunkel lagern.
- Konjugat enthält Evans' Blau, dies könnte krebserregend sein. Vermeiden Sie Kontakt mit der Haut.

Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Die Reagenzien bei 2–8°C lagern. Die Haltbarkeit ist für alle Reagenzien den Etiketten zu entnehmen.

Nicht verwendete Objektträger sollten dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2–8°C gelagert werden. Die Beschichtung ist unter diesen Lagerbedingungen für 2 Monate stabil.

Vor Gebrauch sind die Reagenzien auf Raumtemperatur (20–25 °C) zu bringen und sorgfältig zu mischen. Für das Pipettieren sind Pipettenspitzen aus Kunststoff zu verwenden.

PROBENGEWINNUNG UND AUFBEWAHRUNG

Es ist keine besondere Probenvorbehandlung erforderlich. Serum- bzw. Plasmaproben (EDTA, Heparin) können verwendet werden. Die Proben können 5 Tage bei 2–8°C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei –20°C einfrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden! Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt werden (Vortex).

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Kit enthält genügend Material für 120 Testfelder.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel (nicht im Kit enthalten):

- Aqua dest.
- Waschflasche für PBS
- Präzisionspipetten
- Reagenzgläser zur Serenverdünnung
- 24 x 50 mm Deckgläschen
- Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (maximale Anregungswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 530 nm) und 400X Vergrößerung.
- 37°C-Brutschrank
- feuchte Kammer

Zur Beachtung

- Alle Komponenten sind stabil bis zum Monatsende des Verfalldatums bei einer Lagerung bei +2 bis +8 °C.
- Testbestandteile nur bis zum Ablauf des Verfalldatums verwenden.
- Reagenzien während der Lagerung oder Inkubation vor starkem Lichteinfall schützen.
- Die flüssigen Reagenzien enthalten 0,005 % Thimerosal, das bei Verschlucken evtl. toxisch ist.

Vorbereitung der Proben und Reagenzien

1. Objektträger und Kontrollen aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen. Folie an der Seite einreißen, Objektträger entnehmen und beschriften.
2. Patientenseren 1:64 mit PBS verdünnen.
3. Positiv-Kontrolle und gegebenenfalls Patientenseren mit PBS weitertitrieren. Bereiten Sie Verdünnungen der Positiv-Kontrolle von 1:256, 1:512 und 1:1024 vor. Beachten Sie, daß diese Kontrolle schon 1:64 vorverdünnt ist.

Testdurchführen

1. 10 µL verdünnte Patientenseren auf die entsprechenden Testfelder pipettieren.
2. Bei jeder Testdurchführung eine Negativkontrolle und die vorgeschriebenen Verdünnungen der Positivkontrolle mitführen.
3. Objektträger in feuchter Kammer für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubieren.
4. Objektträger aus der Kammer nehmen. Spülen Sie die Objektträger mit einer Wsschenflasche mit einem sanften Strahl mit PBS. Puffer in den Abfluss abschütteln und den Waschvorgang zweimal wiederholen.
5. Auf jedes Testfeld einen Trpfen (10µl) Konjugat geben und 30 Minuten in einer feuchten Kammer dunkel (das Konjugat ist lichtempfindlich) bei 37°C inkubieren.
6. Waschen Sie die Objektträger wie in Schritt 4 beschrieben.
7. Geben Sie auf jeden Objektträger 2-3 Tropfen Eindeckmittel und legen Sie Deckgläschen darauf.
8. Reaktionsfelder bei 400-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Vergleichen Sie die Reaktionen mit der positiven und der negativen Kontrolle. Angefärbte Objektträger können für bis zu 24 Stunden bei 2–8°C in der Dunkelheit gelagert werden.
9. Für eine optimale Fluoreszenz, die Objektträger am selben Tag untersuchen; bis zur Auswertung im Dunkeln bei +2 bis +8 °C aufbewahren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedesmal, wenn ein oder mehrere Objektträger angefärbt werden, sollten sowohl Positiv- als auch Negativkontrolle mitgeführt werden. Der Endtiter der Positivkontrolle sollte bei einer Verdünnung von 1:8 der gebrauchsfertigen (1:64 vorverdünnten) Kontrolle liegen (also bei 1:512). Je nach Laborbedingungen bzw. technischer Ausstattung kann der Endpunkt zwischen einer Verdünnung von 1:4 und 1:16 der vorverdünnten Kontrolle liegen (also bei 1:256 oder 1:1024). Die Negative Kontrolle sollte keine Fluoreszenz aufweisen. Weichen die Ergebnisse der Kontrollen von diesen Angaben ab, sollten die Patiententests als ungültig betrachtet und der Test wiederholt werden.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Eine positive Reaktion zeigt mindestens eine 1 + Reaktion der Einschlusskörper. Die Testfelder müssen mit Reaktionen der Positiv- und Negativkontrolle verglichen werden. Fluoreszenzmuster, die nicht denen der Positivkontrolle entsprechen, müssen als unspezifisch (und damit negativ) gelten.

ERGEBNISSE DER PATIENTENPROBEN

≥1:64: IgG Titer von 1:64 und grösser sind positiv. Positive Seren sollten austitriert werden, um ihren Endtiter für den Vergleich mit Enttitern anderer Proben vom gleichen Patienten festzustellen.

<1: 64: Titer < 1:64 werden als negativ auf Antikörper gegen *Babesia microti* betrachtet. Wurde die Probe bei Einsetzen der Symptomatik genommen, sollten im Verlauf weitere Proben genommen werden, um eine Serokonversion zu zeigen (oder auszuschliessen). Dies gilt besonders, wenn schon eine antibiotische Therapie eingeleitet worden war.

EINSCHRÄNKUNGEN

Kreuzreaktionen mit *Plasmodium* spp wurden dokumentiert. Die Kreuzreaktivität mit *Babesia divergens*, die schwerere Infektionen in europäischen Patienten hervorruft, wird gegenwärtig untersucht

ZU ERWARTENDE BEFUNDE

Die Spezifität der vorherrschenden Antikörper ist abhängig von der geographischen Region und der Bevölkerungsgruppe, die getestet wird.

LITERATUR

Krause, P. J., S. R. Telford 3rd, R. Ryan, P. A. Conrad, M. Wilson, J. W. Thomford, and A. Spielman. 1994. Diagnosis of babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. *J. Infect. Dis.* 169:923-926

Revised 7/99

Version B 12/2009