

ISTRUZIONI PER L'USO

Kit IFA per anticorpi IgG Anti-Babesia microti

Numero di catalogo: **BMG-120**

Quantità: **120 test**

Conservazione: **2-8°C**

Test in immunofluorescenza per la rilevazione e la determinazione semiquantitativa della classe degli anticorpi IgG contro *Babesia microti* nel siero o nel plasma umano

Esclusivamente per uso diagnostico in vitro



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



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

USO PREVISTO

Il kit per anticorpi IgG anti-*Babesia microti* destinato alla rilevazione e determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgG contro *Babesia microti*, è usato quale sussidio per la diagnosi dell'infezione umana da parte di questo agente patogeno

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La Babesiosi in Nord America è causata dal protozoo *Babesia microti*. E' trasmessa attraverso la puntura di zecche infettate ed è riconosciuto che la Babesiosi può essere trasmessa insieme ad *Anaplasma phagocytophila* (HGE) e/o *Borrelia burgdorferi*. Storicamente la diagnosi veniva effettuata attraverso la dimostrazione delle caratteristiche inclusioni intraeritrocitarie in sottili strisci di sangue periferico. L'IFA TEST utilizza eritrociti di criceti o di topi infettati da *Babesia microti* come caratteristiche inclusioni per la determinazione di specifici anticorpi.

I sieri dei pazienti sono diluiti in soluzione salina tamponata e incubati nei singoli pozzetti del vetrino per permettere la reazione degli anticorpi del paziente con gli antigeni *Babesia microti*. I vetrini vengono poi lavati per rimuovere quanto non ha reagito e sui pozzetti del vetrino viene aggiunto il coniugato anti-umano marcato DyLight 488 onde ottenere il complesso antigene-anticorpo. Dopo ulteriore incubazione il vetrino viene lavato per eliminare ogni eccesso di coniugato. La reazione risultante può essere osservata con un microscopio a fluorescenza; una reazione positiva si può osservare come una distinta fluorescenza di colore "mela-verde" inclusa negli eritrociti infettati. In una reazione negativa non si distingue fluorescenza o si vede una fluorescenza diversa da quella riscontrata nel controllo positivo. Una reazione positiva potrebbe essere ritestata ad una diluzione maggiore per determinare una più alta reattività o l'endpoint della diluzione

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

IFA Ag x 12 Vetrini con substrato (10)

Dieci vetrini contenenti dodici pozzetti. Ogni pozzetto contiene eritrociti di criceto o di topo infettati da *Babesia microti*; confezionati sotto vuoto

CONJ FITC Coniugato per IgG, 2.5 mL

Flacone con contagocce, tappo giallo, contenente coniugato antiumano di capra coniugato DyLight 488 (catena pesante specifica) con albumina bovina serica e contrastante Blue Evans'

CONT + Controllo Positivo, 0.5 mL

Flacone con contagocce, tappo blu, contenente siero umano alla diluzione di screening 1:64 con titolo ad end-point 1:512.

CONT - Controllo Negativo, 0.5 mL

Flacone con contagocce, tappo rosso, contenente pool di sieri umani non reattivo alla diluizione di 1:50.

MM Tampone di montaggio, 1 mL

Flacone con contagocce, tappo bianco, contenente 50% glicerolo in PBS, pH 7,2.

BUF WASH PBS PBS, 1 litro

Aggiungere il contenuto di una bustina ad 1 litro di acqua distillata per ottenere la soluzione tampone a pH 7,2

Precauzioni e avvertenze

Tutti I componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti HCV-Ab e AbsAg. Nonostante ciò, tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi: evitare il contatto con la pelle o l'ingestione.

I vetrini substrato sono stati preparati con antigeni chimicamente inattivati. Devono comunque essere considerati potenzialmente infetti; manipolare con adeguata attenzione.

Modalità di conservazione e manipolazione

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Riportarli a temperatura ambiente prima dell'uso. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione

Prelievo e preparazione dei campioni

Usare campioni di siero umano. Se il test viene fatto entro 24 ore dal prelievo, i campioni possono essere conservati tra 2-8°C, altrimenti devono essere aliquotati e congelati a -20°C o inferiore. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.* Per verificare la sieroconversione, prelevare i campioni in fase acuta e in fase convalescente a 2, 4 settimane d'intervallo, confermare il cambio di titolo anticorpale.

PROCEDURA

Materiali forniti

Il kit contiene reattivi e materiali sufficienti per 120 determinazioni

Materiali Richiesti ma Non Forniti

- Acqua purificata (distillata o deionizzata)
- Vetreria da laboratorio da 250 o 500 mL per tampone di lavaggio PBS
- Provette o micropiastre per le diluizioni manuali
- Pipetta(e) di precisione per le diluizioni manuali
- Vetrini coprioggetto 24 x 50 mm
- Microscopio a fluorescenza con filtri per il sistema FITC (massima eccitazione lunghezza d'onda 490 nm, lunghezza d'onda di emissione media 530 nm) e 400X ingrandimento
- Incubatore a bagno d'acqua a 37°C
- Camera umida per passaggi di incubazione

Avvertenze

- Non usare alcun componente dopo la data di scadenza.
- Il coniugato è fotosensibile ed a protezione è confezionato in contenitore di plastica opaca. Conservare al buio e riporlo subito dopo l'uso.
- Il coniugato contiene blue Evans che può essere cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle.
- I reagenti liquidi contengono Thimerosal 0,001% che potrebbe essere tossico se ingerito

PROCEDIMENTO

Portare tutti i reagenti e i sieri a temperatura ambiente prima di iniziare le analisi

1. Per i campioni di siero dei pazienti preparare diluizioni di screening 1:64 in PBS. Per sieri, riconosciuti come positivi da precedenti analisi, preparare ulteriori diluizioni seriali in PBS a partire da 1:64
2. Per il Controllo Positivo preparare diluizioni in PBS che includano una diluizione sopra ed una sotto di quella riportata come end-point (ie. 1:256- 1:1024). Il controllo è confezionato con diluizione 1:64.
3. Dispensare, per ogni diluizione di siero, circa 10 µL in un pozzetto di reazione ed annotare la posizione per il successivo riferimento. Per ogni sessione d'analisi includere le diluizioni del siero di controllo positivo previste al punto dispensare inoltre in un pozzetto (10 µL) di controllo negativo tal quale.

4. Riporre i vetrini in camera umida per 30 minuti a 37°± 0.5°C.
5. Rimuovere i vetrini dall'incubatore e dalla camera umida. Lavare i vetrini con un leggero flusso di PBS per tre volte. Lasciare i vetrini a bagno in PBS per almeno 5 minuti. Rimuovere l'eccesso di PBS dai vetrini, eseguire il passaggio successivo evitandone la completa asciugatura.
6. Aggiungere ad ogni pozzetto una goccia (10 µL) di Coniugato, riporre nuovamente i vetrini in camera umida nell'incubatore. Incubare 30 minuti a 37°± 0.5°C. L'incubazione dovrebbe essere fatta al buio per proteggere il coniugato fotosensibile
7. Lavare i vetrini come al punto 5-6.
8. Aggiungere 2-3 gocce di liquido di montaggio ad ogni vetrino ed applicare il vetrino coprioggetto evitando di intrappolare bolle d'aria.
9. Leggere i vetrini con il substrato con ingrandimento 400X, comparando ogni pozzetto con quanto osservato sui pozzetti Positivo e Negativo. I vetrini possono essere conservati al buio e a 2-8°C per 24 ore

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il siero di Controllo Negativo e le diluizioni del siero di Controllo Positivo dovrebbero essere incluse in ogni sessione d'analisi. Il Controllo Negativo è un esempio di reazione negativa con sia il colore rossastro di contrasto distribuito uniformemente che con una leggera colorazione verdastra uniformemente diffusa. I pozzetti del Controllo Positivo dovrebbero dare un titolo ad endpoint compreso tra 1:256 e 1:1024. L'intensità di fluorescenza a 1:512 può essere usata come livello di cut-off per la definizione di positività di un campione in esame. Se per i controlli non si riscontrano i valori previsti la sessione d'analisi, deve essere invalidata e ripetuta, tutti i reattivi ed i passaggi della procedura devono essere verificati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una reazione positiva appare come un periferico gruppo di corpi distintamente colorati di verde-mela inclusi negli eritrociti infettati. La quantità, la qualità e la densità della reazione deve essere comparata con la reazione dei controlli Positivo e Negativo

CAMPIONI DI SIERO

Positivo a 1:64: Titoli di IgG 1:64 e maggiori indicano un'infezione pregressa (sieropositivo) da *Babesia microti*. I sieri positivi dovrebbero essere titolati onde ottenere il valore di end-point per comparazione con valori precedenti o successivi dello stesso paziente. Titoli di IgM, quando presenti, sono un buon indicatore di infezione recente.

Negative at 1:64: Viene considerato negativo per anticorpi anti *Babesia microti*. Se il prelievo è avvenuto immediatamente dopo l'instaurarsi dell'infezione si consiglia un ulteriore prelievo ed analisi.

LIIMITAZIONI

Crossreattività con *Plasmodium spp* è stata documentata. Crossreattività con *Babesia divergens*, che causa più severe infezioni in pazienti Europei, è attualmente oggetto di indagine

REFERENCES

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