

Návod k použití

Souprava pro imunofluorescenční detekci IgG protilátek proti Q horečce

Katalogové číslo: QG-120
Velikost: 120 testů
Uchovávání: 2-8°C

Nepřímá imunofluorescenční imunoanalýza pro detekci IgG třídy protilátek proti *Coxiella burnetii*, fáze I a fáze II, v lidském séru nebo plazmě

Pouze pro diagnostické účely in vitro

CE



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

Zamýšlené použití

Tento test je určen pro detekci a semikvantifikaci IgG lidských protilátek proti *C. burnetii* fáze I a fáze II jako pomoc při diagnostice lidské infekce způsobené tímto patogenem.

Shrnutí a vysvětlení testu

Coxiella burnetii je obligátní intracelulární bakteriální parazit eukaryotických buněk. Lidé jsou nejčastěji nakaženi kapenkami od infikovaných zvířat, nebo méně často kousnutím nakaženým kličtářem. Inhalovaná agens se začínou z plic šířit. Způsobují Q horečku, onemocnění podobné chřipce. Chronická choroba se vyvine u přibližně 5 % případů, primárně jako chronická granulomatózní hepatitida, nebo méně často jako endokarditida.

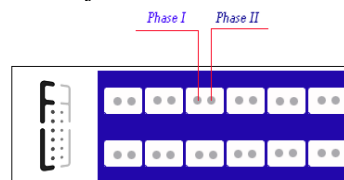
Díky nedostatku charakteristických symptomů u akutního onemocnění a rizikům spojeným s laboratorní izolací se pro diagnostiku používají serologické metody. Pro rozlišení akutní odpovědi rekonvalescentů a chronické protilátkové odpovědi využívá IFA test jedinečných fázových rozdílů nalezených u *C. burnetii*. Ředěná séra pacientů simultánně reagují s agens ve fázi I i ve fázi II v každé jamce sklička. Po promytí a odstranění nezařadovaných sérových proteinů je přidán IgG specifický značený konjugát. Výsledná reakce je vizualizována použitím standardního fluorescenčního mikroskopu, kde pozitivní reakce vypadá jako ostrě ohraničená zelená fluorescenční elementární tělíska v červeném kontrastním poli sonikátu žlutkového vaku. Takto pozitivní reakce se může dále testovat ve vyšších ředěních k určení konečného titru.

REAGENCIE

IFA Ag x 12

Substrátová skla (10 kusů)

10 x 12-jamková skla obsahující *C. burnetii* fáze I na levé straně jamky a fáze II na pravé straně jamky. Formalinem inhibovaný substrát je fixován acetonem a balený ve vakuu.



CONJ FITC

Konjugát, 2,5 mL

Kapací lahvička se žlutým víčkem obsahující afinitně purifikovaný Dylight 488 značené kozí antilidské IgG (těžký řetězec) s bovinním sérovým albuminem a Evansovou modří jako kontrastním barvivem.

CONT +

Pozitivní kontrola, 0,5 mL

Kapací lahvička s modrým víčkem obsahující reaktivní lidské sérum v screeningovém ředění 1:16 s konečným titrem 1:128 (fáze I) a 1:512 (fáze II).

CONT -

Negativní kontrola, 0,5 mL

Kapací lahvička s červeným víčkem obsahující nereaktivní lidské sérum ve screeningovém ředění 1:16.

SAMP DIL

IgG Ředící roztok pro vzorky, 20 mL

Pufr obsahující kozí sérum v PBS.

MM

Montovací médium, 1 mL

Kapací lahvička s bílým víčkem obsahující 50% glycerol v PBS.

BUF WASH PBS

PBS, 1 litr

Prášek dejte do 1 litru purifikované vody pro vytvoření PBS o pH 7.2.

Upozornění

Kontrolní séra byla vyšetřena na přítomnost infekčních agens pomocí FDA doporučené testovací metody. Žádný z testů ale nezaručí nepřítomnost infekčních agens, proto se všemi reagensy zacházejte v souladu se správnou laboratorní praxí. Substrátová skla jsou připravována s chemicky inaktivovaným antigenem. Přesto považujte skla za potenciálně infekční a podle toho s nimi zacházejte.

Uchovávání a skladování

Souprava se musí uchovávat při 2-8 °C. Před otevřením všechny komponenty nechte vytemperovat na pokojovou teplotu (20-25 °C).

SBĚR VZORKŮ

Separujte sérum ze sražené krve a uložte ve sterilních nádobkách při 2-8 °C. Pokud testujete až po 5 a více dnech, zamrazte séra na -20 °C. Akutní séra by měla být odebrána při nástupu onemocnění, u rekonvalescentních sér odběry opakujte po 2-4 týdnech kvůli kontrole změny titru.

POSTUP

Souprava obsahuje dostatek reagensů pro 120 jamek.

Požadovaný ale nedodávaný materiál

- destilovaná nebo deionizovaná voda
- čisté 250 nebo 500 ml láhev na PBS
- promývací lázeň s držákem sklíček
- testovací zkumavky nebo mikrotitrační destička na sérové ředění
- přesná pipeta
- 24x50 mm krycí sklička
- fluorescenční mikroskop s filtrem pro FITC
- 37 °C vodní lázeň nebo inkubátor
- vlhká komůrka

Upozornění

- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
- Konjugát je fotosenzitivní.
- Konjugát obsahuje Evansovu modř, Vyvarujte se styku s kůží.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Připravte si screeningové ředění 1:16 v IgG Sample Diluentu pro všechna zatím netestovaná séra. Pro pozitivní séra z předchozích analýz, připravte sériové dvojkové ředění v PBS.
2. Připravte ředění pozitivní kontroly v PBS, tak aby zahrnovalo jedno ředění nad konečným titrem a jedno ředění pod konečným titrem.
3. Pro každé naředěné sérum přidejte 15 µl na každou jamku sklička a označte pro pozdější vyhodnocení. Pro každou analýzu testujte negativní i pozitivní kontrolu připravenou podle bodu 2.
4. Umístěte sklička do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37± 0.5°C .
5. Vyjměte vlhkou komůrku z inkubátoru nebo vodní lázně. Promyjte jamky 3x pomocí slabého proudu PBS. Vytreptejte pufr ze sklíček.
6. Do každé jamky sklička přidejte 15 µl (1 kapku) konjugátu a vraťte zpět do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37± 0.5°C ve tmě.
7. Promyjte skla dle bodu 5, potom přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé skličko a přikryjte krycím sklem.
8. Odečtěte nabarvená sklička při 400x zvětšení vzhledem k intenzitě záření negativní a pozitivní kontroly. Pamatujte,

že v mikroskopu je antigen fáze 2 na levé straně a antigen fáze 1 na straně pravé vašeho zorného pole. Sklička se uchovávají při 2-8°C ve tmě po dobu 24 hodin.

KONTROLA KVALITY

Negativní kontrolní sérum a naředěné pozitivní kontrolní sérum by se mělo vyšetřovat každý den. Negativní kontrola je příklad nereaktivního séra, které se vyznačuje jednotným červeným zbarvením kontrastním barvivem. Jamka pozitivní kontroly by měla mít konečný titr v dvojkovém ředění tak, jak je určeno pro toto sérum. Pokud žádná z kontrol nereaguje tak jak je popsáno, analýza by měla být zrušena, reagensie a pracovní postup by se měly znovu přezkontrolovat a celý postup se musí zopakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Positivní reakce vypadá jako jasně zářící (nejméně na 1 křížek) elementární tělíska na červeném pozadí. Velikost částic, vzhled a hustotu pole je třeba porovnat s negativní a pozitivní kontrolou. Jiný typ reaktivity odlišný od pozitivní kontroly je třeba odečíst jako nespecifický.

VZORKY PACIENTŮ

Pozitivní ve screeningovém ředění 1:16: IgG titry 1:16 a vyšší proti fázi II ukazují na infekci v neurčeném čase (séropozitivita) Titry proti fázi I by měly být ve většině případů stejné nebo vyšší oproti titrům fáze II. Pozitivní séra by se měla znovu testovat až do zjištění konečného titru kvůli srovnání s dříve nebo později odebranými vzorky od stejného pacienta.

Negativní v titru 1:16: Zaznamenejte jako negativní na protilátky proti *C. burnetii*. Další vzorek je vhodné vyšetřit v případě, kdy sérum bylo odebráno ihned po nástupu symptomů, hlavně pokud byla zahájena antibiotická léčba.

LIMITACE

Organismy fáze II mají v buněčné membráně IgG Fc receptory. IgG Sample Diluent je určen pro vysycení receptorů nevýznamnými (kozími) IgG, tak aby umožnil specifickou IgG reakci s lidským sérovým vzorkem. Zvýšené hladiny sérových IgG mohou vést k nízkým nespecifickým titrům dokonce i v přítomnosti speciálního diluentu, ačkoliv byly specificky spojeny s organismem fáze II a nebyly doprovázeny IgM nebo IgA titry.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Rozšíření specifických protilátek závisí na zeměpisné oblasti a testované populaci. IgG titry fáze II jsou obecně detekovatelné během prvního týdne po nástupu a vrcholu dosáhnou kolem osmého týdne. Většina akutních případů má stále pozitivní titr IgG protilátek fáze II i po 1 roce.

IgG titry fáze I narozdíl od fáze II, jsou velmi často pod detekovatelnou hladinou, pokud se nerozvine chronické onemocnění. Chronická hepatitida je charakterizována vysokými a vyrovnanými titry fáze I i fáze II, kdežto u endokarditidy jsou vyšší titry fáze I. IgM a IgA titry proti těmto antigenům také pomáhají v diferenciální diagnostice.

LITERATURA

Peacock MG, Philip RN, Williams JC, Faulkner RS. Serological Evaluation of Q Fever in Humans. *Infect. Immun.* 1983;41: 1089-1098.

Revised 7/99