

## Návod k použití

### Souprava pro imunofluorescenční detekci IgM protilátek proti Q horečce

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

Nepřímá imunofluorescenční imunoanalýza pro detekci IgM 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 IgM lidských protilátek proti *Coxiella 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 kapénkami od infikovaných zvířat, nebo méně častěji kousnutím nakaženým klíštětem. Inhalovaná agens se začíná 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.

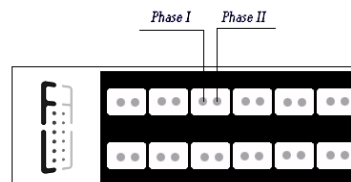
Díky nedostatku charakteristických symptomů u akutního onemocnění a rizikům spojeným s laboratorní izolací se pro diagnostiku používají serologické metody. Pro rozlišení akutní odpovědi rekonvalescentů a chronické protilátkové odpovědi využívá IFA test jedinečných fázových rozdílů nalezených u *C. burnetii*. Ředěná séra pacientů simultánně reagují s agens ve fázi I i ve fázi II v každé jamce sklička. Po promytí a odstranění nezreagovaných sérových proteinů je přidán imunoglobulin specifický značený konjugát. Výsledná reakce je vizualizována použitím standardního fluorescenčního mikroskopu, kde pozitivní reakce vypadá jako ostře 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 8**

#### Substrátová skla (10 kusů)

10 x 12-jamková skla obsahující *Coxiella burnetii* fáze I na levé straně jamky a fáze II na pravé straně jamky, pokud jsou skla situována mléčným koncem vlevo. 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 oslí antilidské IgM (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.

**IgM DIL**

#### IgM Sample Diluent, 15 mL

PBS obsahujícího kozí anti-lidský IgG (těžký řetězec).

**MM**

#### Montovací médium, 1 mL

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

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

### Upozornění

1. Kontrolní séra byla vyšetřena na přítomnost infekčních agens pomocí FDA doporučené testovací metody. Žádný z testů ale nezaručí nepřítomnost infekčních agens, proto se všemi reagenčními zacházejte v souladu se správnou laboratorní praxí.

2. 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 nechejte 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 reagenčních pro 80 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 a je balen v ochranném obalu. Uchovávejte ve tmě.
- Konjugát obsahuje Evansovu modř, Vyvarujte se styku s kůží.

### PRACOVNÍ POSTUP

1. Připravte si screeningové ředění 1:16 v IgM 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. Poznámka: Pozitivní kontrola nemá stejný titr pro antigen fáze 1 a fáze 2. Doporučujeme sérii ředění pozitivní kontroly od 1:2 do 1:32.
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. Vytřepte 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
8. Přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé skličko a přikryjte krycím sklem.
9. Odečtete 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 mělo být testováno každý den. Jamky pozitivní kontroly by měly vykazovat konečný titr +/- jedno ředění od stanovených hodnot. Pro antigen fáze I je to 1:128, pro fázi II 1:512, za předpokladu že kontrola v lahvičce je ve screeningovém ředění 1:16. Pokud není kontrola v tomto limitu, analýza by měla být zrušena, reagence a pracovní postup by se měly znovu překontrolovat a celý postup se musí zopakovat.

Negativní kontrola je příkladem fluorescence, která se odečte jako negativní výsledek. Jestliže pozorujete záření i v tomto poli, shodně se zářením pozitivní kontroly, došlo k chybě v pracovním postupu a celou analýzu je třeba zopakovat.

### INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pozitivní 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:** IgM titry 1:16 nebo vyšší proti fázi I nebo II jsou důkazem nedávné nebo akutní infekce. 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:** Zznamenejte 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

IgM titry mohou přetrvávat více než rok a být následovány chronickým onemocněním (endokarditida nebo chronická hepatitida).

### OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Rozšíření specifických protilátek je limitováno výskytem aktivní nebo nedávné infekce *C. burnetii*. Titry IgM protilátek fáze I a II jsou často detekovány během prvního týdne po nástupu symptomů a vrcholu nabývají po 3-4 týdnech. Titry u nekomplikované Q horečky klesají po 10-12 týdnech, ale mohou přetrvávat déle u chronické choroby.

### 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**