

GEBRAUCHSANLEITUNG

Q-Fieber IFA IgM Antikörper Kit

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

Ein indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis humaner IgM Antikörper gegen *Coxiella burnetii*

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 Q-Fieber IgM Antikörper Immunfluoreszenztest (IFT) ist zum semi-quantitativen Nachweis humaner IgM- Antikörper gegen Phase I und II-Antigene von *Coxiella burnetii* bestimmt und soll die Diagnose menschlicher Infektionen durch diesen Krankheitserreger unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Coxiella burnetii, ist ein obligater Zellparasit (Familie der *Rickettsien*) mit weltweiter Verbreitung. Menschen werden häufig durch Inhalation erregerhaltiger Aerosole oder seltener durch Zeckenbisse infiziert. Inhalierbare Organismen verbreiten sich systematisch von der Lunge aus im Körper des Wirtes und verursachen das sogenannte Q-Fieber, eine nur schwer zu behandelnde Erkrankung, deren Symptome stark an Grippe erinnern. Ein chronischer Verlauf tritt in ungefähr 5% der Fälle ein und manifestiert sich hauptsächlich in Form einer chronischen granulomatösen Hepatitis oder seltener als Endokarditis.

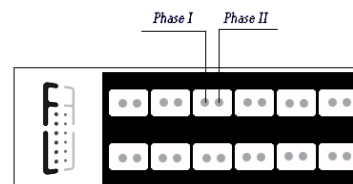
Aufgrund des Mangels an charakteristischen Symptomen während des akuten Krankheitsverlaufes und der Gefahren, die mit der Erregerisolierung verbunden sind, stellen serologische Verfahren das Mittel der Wahl zur Unterstützung der klinischen Diagnose dar. Der IFT verwendet die dem Organismus eigene Phasenveränderung zur Differenzierung einer akuten Immunantwort von einer chronischen oder rekonvaleszenten Verlaufsform. Verdünnungen des Patientenserums werden mit den auf den Objektträgern aufgebrauchten Phase I und Phase II Organismen inkubiert. Nach dem Entfernen ungebundener Serumproteine wird die spezifische Reaktion mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem anti-human IgM Konjugat im Standard-Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Positive Reaktionen erscheinen als scharf begrenzte, apfelgrün fluoreszierende Elementarkörper innerhalb eines in roter Gegenfärbung erscheinenden Bereiches, der durch Eigelb hervorgerufen wird. Positive Seren können zur Endtiter-Bestimmung in austitrierter Form erneut im Test eingesetzt werden.

REAGENZEN UND IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

IFA Ag x 12

Substrat-Objektträger (10)

Zehn Objektträger mit jeweils zwölf Reaktionfeldern, die mit *Coxiella burnetii* Phase I und Phase II. Die mit Formalin abgetöteten Substratorganismen sind Aceton-fixiert und vakuumverpackt.



CONJ FITC

IgM Konjugat, 2,5 mL

Tropferflasche mit gelbem Verschluss enthält affinitätsgereinigtes Esel anti-human-IgM-DyLight 488 Konjugat (schwere Kette) mit Rinderserumalbumin und Evans Blau zur Gegenfärbung.

CONT +

Positive Kontrolle, 0,5 mL

Tropferflasche mit blauem Verschluss enthält vorbehandeltes reaktives, gebrauchsfertiges Humanserum, in einer 1:16 Screening-Verdünnung. Phasenspezifische Titer sind 1:128 (Phase I) und 1:512 (Phase II).

CONT -**Negative Kontrolle, 0,5 mL**

Tropferflasche mit rotem Verschluss enthält vorbehandeltes negativ Humanserum in einer 1:16 Screening-Verdünnung.

SAMP DIL**IgM Verdünnungspuffer, 15 mL**

Pufferlösung enthält Ziege anti-human-IgG Antikörper in PBS.

MM**Eindeckmedium, 1 mL**

Tropferflasche mit wiessem Verschluss enthält 50% Glycerol in PBS.

BUF WASH PBS**PBS, 1 Liter**

Pulver mit 1 Liter gereinigtem Wasser verdünnen, um PBS mit pH 7,2 herzustellen.

Warnhinweise

Die Kontrollseren wurden mit den von der FDA geforderten Screening Testverfahren auf das Vorhandensein von Krankheitserregern geprüft. Es gibt allerdings keine Tests, die die Abwesenheit von Krankheitserregern sicherstellen könnten. Daher sind diese Reagenzien sowie alle Seren und Gerätschaften, die mit diesen Proben in Kontakt kommen, entsprechend den GLP-Vorschriften zu handhaben, um Berührung mit der Haut bzw. Verschlucken zu vermeiden.

Zur Herstellung der beschichteten Auftragstellen werden inaktivierte Antigene herangezogen. Dennoch sollten sie als potentiell infektiös angesehen und entsprechend gehandhabt werden.

Aufbewahrung und Handhabung

Kit-Komponenten bei 2–8°C lagern.

Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) zu bringen

PROBENENTNAHME

Blutproben koagulieren lassen und Seren durch Zentrifugieren trennen. Die Seren anschließend auf aseptische Weise in dicht schließende sterile Behälter überführen. Bei 2–8 °C aufbewahren. Wenn die Tests nicht innerhalb von 5 Tagen durchgeführt werden können, die Proben bei -20 °C oder kälteren Temperaturen aufbewahren. Akut-Proben sind bei Krankheitsbeginn zu entnehmen, Rekonvaleszenz-Proben zur Feststellung von Titeränderungen in Intervallen von zwei bis vier Wochen.

VERFAHREN

Dieser Kit enthält genügend Reagenzien und Materialien für 120 Bestimmungen.

Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

- Gereinigtes (destilliertes oder entionisiertes) Wasser.
- Saubere, 250 ml oder 500 ml fassende Waschflaschen für PBS
- Wasserbad mit Objektträger-Halterung
- Röhrchen oder Mikrotiterplatten zur Herstellung von Verdünnungen
- Präzisionspipetten für die Herstellung/Überführung von verdünnten Lösungen
- 24 x 50 mm Deckgläschen
- Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (maximale Exzitationswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 530 nm) und 400facher Vergrößerung
- 37°C Wasserbad oder Brutschrank
- Feuchte Kammer zur Inkubation der Objektträger

Vorsichtsmaßnahmen

- Keine Komponenten nach deren Verfallsdatum verwenden.
- Das Konjugat ist lichtempfindlich und wird daher in einer lichtdichten Plastikflasche bereitgestellt. Im Dunkeln aufbewahren und nach Gebrauch sofort wieder an den Aufbewahrungsort zurückbringen.
- Das Konjugat enthält Evans Blau. Evans Blau ist potentiell karzinogen, daher Berührung mit der Haut vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. 1:16 Screening-Verdünnung aller ungetesteten Patientenserum in IgM-Verdünnungspuffer herstellen. Aus Seren, die zuvor bereits positiv getestet wurden, eine serielle 2fach Verdünnung aus der Screeningverdünnung in PBS herstellen.
2. Verdünnungen der Positiv-Kontrolle in PBS erstellen. Die Verdünnungsreihe sollte so angelegt sein, dass sie Verdünnungstufen enthält, die jeweils eine Verdünnungsstufe oberhalb und eine Verdünnungsstufe unterhalb des angegebenen Endtiters liegen.
3. Je Patient 15 µl verdünntes Patientenserum auf jeweils eine Auftragsstelle des Objektträgers geben und Positionierung dokumentieren. Für jeden Testdurchlauf Negativkontrolle sowie die Verdünnungen der Positivkontrolle (Herstellung siehe Schritt 2) mittesten.
4. Objektträger in feuchte Kammer geben und für 90 min bei 37°±0,5°C inkubieren.
5. Feuchte Kammer aus Inkubator oder Wasserbad entnehmen. Auftragstellen des Objektträgers vorsichtig 3 x mit einem sanften Strahl PBS aus der Waschflasche abspülen, Objektträger über einer Spüle vorsichtig ausschütteln, um restlichen Puffer zu entfernen.
6. Auf jede Auftragstelle 15 µl (1 Tropfen) Konjugat geben und Objektträger in feuchter Kammer bei 37°±0,5°C für 30 min inkubieren. Die Inkubation sollte zum Schutz des Konjugates im Dunkeln erfolgen.
7. Objektträger wie in Schritt 5 beschrieben waschen, anschließend 2-3 Tropfen Eindeckmedium auf jeden Objektträger geben und mit Deckgläschen versehen.
8. Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung ablesen, dabei jede Auftragstelle in ihrer Farbintensität mit dem Erscheinungsbild der Positiv- und Negativkontrollen vergleichen. Beachten Sie, dass aufgrund der optischen Eigenschaften des Mikroskopes das Phase II Antigen auf der linken und das Phase I Antigen auf der rechten Seite des Auftragsfeldes erscheint. Gefärbte Objektträger können bei 2-8°C im Dunkeln bis zu 24 Stunden gelagert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Negativkontrolle und Verdünnungen der Positivkontrolle sollten täglich mitgeführt werden. Die Negativkontrolle dient als Beispiel eines nicht-reaktiven Serums, die bei Auswertung eine gleichmäßige rote Gegenfärbung aufweist. Die Positivkontrolle sollte einen Endtiter innerhalb der zweifachen Verdünnung des im **Reagenzien und Materialien** angegebenen Titers aufweisen. Sollte eine der beiden Kontrollen nicht das erwartete Ergebnis zeigen, ist der gesamte Testdurchlauf als ungültig zu betrachten. Testkomponenten und -durchführung sollten überprüft und der gesamte Test von Anfang an wiederholt werden.

Die Negativkontrolle ist ein Beispiel für Fluoreszenzmuster, die als negativ zu interpretieren sind. Sollte innerhalb dieser Auftragstelle eine hell fluoreszierende Färbung zu sehen sein, die mit der der Positivkontrolle vergleichbar ist, so ist der Testdurchlauf fehlgeschlagen und muss wiederholt werden.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Eine positive Reaktion erscheint als helle Färbung (mindestens 1+) der Elementarkörper gegen den rot gefärbten Hintergrund aus Eigelb. Die Partikelgröße, das Erscheinungsbild und die Dichte muss mit den Reaktionen der Positiv- und Negativkontrollen verglichen werden. Erscheinungsmuster, die von denen der Kontrollen abweichen, müssen als unspezifisch bewertet werden.

PATIENTENPROBEN ERGEBNISSE

Positiv bei 1:16 Screening-Verdünnung : Deutlicher Hinweis auf kürzliche Infektion gegen mit *C. burnetii*. Phase I Antikörper Titer, die höher Antigene oder gleich hoch wie Phase II Antikörpertiter sind, der Phase I weisen auf eine chronische Infektion oder das und II Gesundheitsstadium einer Erkrankung durch Q-Fieber

Negativ bei 1:16 Verdünnung: Als negativ für *Coxiella burnetii* IgM Antikörper bewerten. Weitere Serumproben sollten entnommen werden, wenn die Entnahme der ursprünglichen Probe unmittelbar nach Einsetzen der Symptome erfolgte.

ERWARTUNGSWERTE

1. In Seren von Patienten mit Q-Fieber, treten häufig IgM Antikörpertiter von 1:64 und höher auf. Bei Vorliegen eines akuten Q-Fiebers sind die Phase II Antikörpertiter normalerweise höher als die Phase I Titer, selbst bei Frühstadien. Obgleich ein Titeranstieg sowohl bei Phase I als auch bei Phase II Antikörpern auftreten kann, bleibt der Phase II Titer bei Proben aus späteren Stadien höher.
2. Der umgekehrte Fall tritt gewöhnlich bei chronischem Q-Fieber auf. Phase I Titer steigen in Proben aus späten Stadien, während die Phase II Titer fallen oder konstant bleiben. In Serumproben von Patienten in einem späten Stadium mit chronischem Q-Fieber, sind die Phase I Titer signifikant höher, in einigen Fällen um weit mehr als das Vierfache.
3. IgM Antikörpertiter treten im Verlauf der Krankheit zu einem frühen Zeitpunkt auf, erreichen als Phase II Titer ihren maximalen Titer in der dritten Woche und fallen bis auf niedrige Spiegel bis zur 14. Woche ab. Phase I Titer sind weitaus niedriger, folgen jedoch dem gleichen Muster, und sind möglicherweise nicht vor der Genesungsphase nachweisbar.
4. Im Fall einer chronischen, granulomatösen Hepatitis, sind die IgM Titer gegen Phase I und II deutlich erhöht, dabei sind die Phase II Titer normalerweise gleich hoch oder höher wie die Phase I Titer. Bei der durch Q-Fieber hervorgerufenen Endokarditis liegen die Titer normalerweise in der gleichen Höhe, obgleich die Phase I Titer in der Regel höher als die Phase II Titer sind.

LITERATUR

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

Revised 03/04

