

NÁVOD K POUŽITÍ

Imunofluorescenční souprava (IFA) pro stanovení IgM protilátek proti Rickettsiám

Katalogové číslo: R20M-120
Kapacita: 120 testů
Skladování: 2-8°C

Nepřímá fluorescenční imunoanalýza pro detekci a semikvantitativní stanovení protilátek IgM třídy proti Rickettsiám skupin skvrnitě horečky a typhu v lidském krevním séru nebo plasmě.

Pouze pro in-vitro diagnostické použití



1135 E. Truslow Ave.
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

POUŽITÍ SOUPRAVY

Tato souprava je určena pro současnou detekci a semi-kvantifikaci IgM protilátek proti *Rickettsiám* skupin skvrnitě horečky a typhu a může být použita, jako pomoc při určení diagnózy infekce lidí způsobených těmito patogeny.

SHRNUTÍ A PRINCIP TESTU

Rickettsie skupiny skvrnitě horečky jsou rozšířeny celosvětově a jsou nepřímo přenášeny klišfaty a roztoči (RICKETTSIA AKARI). Nákazy RICKETTSIA RICKETTSII byly nalezeny po celé západní zemské polokouli. Onemocnění RICKETTSIA CONORII (boutoneuská horečka, středomořská horečka), jsou spíše nacházena ve Středomořské oblasti, Africe, Indii a velké části Asie. Mnoho jiných druhů RICKETTSII, původců skvrnitě horečky, je však nalézáno i mimo tyto oblasti.

RICKETTSIE skupiny způsobující typhus jsou přenášeny nakaženými blechami a vešmi. Tato skupina zahrnuje RICKETTSIA TYPHI (endemický typhus) a RICKETTSIA PROWAZEKII (epidemický typhus), oba druhy jsou nalézány celosvětově. Po nákaze organismu vznikají jako reakce na infekci specifické protilátky, které je možno stanovit a použít tak jako nepřímý důkaz identifikace infekce jedince.

IFA sklíčka v této soupravě využívají přečištěné antigeny RICKETTSIA RICKETTSII a RICKETTSIA TYPHI jako dva samostatné terčíky substrátu antigenu, navázané v každé jamce sklíčka. Vzorky krevního séra od pacientů jsou zředěny 1:64 v roztoku PBS pufru a inkubovány v jednotlivých jamkách sklíčka aby mohly reagovat případně protilátky ze sera s antigenem RICKETTSII. Sklíčka jsou po inkubaci omyta z důvodu odstranění nenavázaných zbytků séra a pak je přidán konjugát anti lidského IgM značený FITC, který se váže na dříve vytvořený komplex antigen-protilátka. Po další inkubaci jsou sklíčka opět omyta z důvodu odstranění nenavázaného konjugátu. Výsledek reakce je posuzován na standardním fluorescenčním mikroskopu. Pozitivní reakce je zobrazena jako malé ostře ohraničené fluoreskující tyčinky na červeném pozadí matrice infikovaných buněk. Negativní reakce je zobrazena jako pozadí červených buněk nebo fluorescence vždy rozdílného typu od fluorescence v kontrolní jamce s pozitivní kontrolou. Pozitivní reakce mohou být následně retestovány ve vyšším ředění pro stanovení nejvyššího titru protilátky.

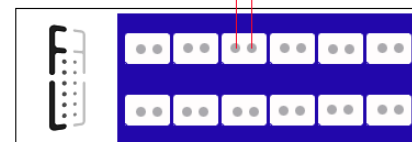
REAGENTY SOUPRAVY

IFA Ag x 12

substrátová sklíčka

10 x 12-jamkových sklíček, obsahujících 2 antigenní terčíky fixované acetonem v každé jamce.

Rickettsia rickettsii *Rickettsia typhi*



CONJ FITC

IgM konjugát, 2.5 ml

Kapací lahvička se žlutým vrškem, obsahující "ready to use" roztok DyLight 488-značené kozí anti-lidské IgM (těžký řetězec), boviní sérový albumin a Evansovu modř.

CONT +**pozitivní kontrola, 0.5 ml
pro skupinu R. skvrnitě horečky**

Kapací lahvička s modrým vrškem obsahující lidské sérum pozitivně reagující s Rickettsiemi skupiny skvrnitě horečky, v základním ředění 1:64. Endpoint titr je 1:512.

CONT +**pozitivní kontrola, 0.5 ml
pro skupinu R. typhu**

Kapací lahvička se zeleným vrškem obsahující lidské sérum pozitivně reagující s Rickettsiemi skupiny typhu, v základním ředění 1:64. Endpoint titr je 1:512.

CONT -**negativní kontrola, 0.5 ml**

Lahvička s červeným vrškem obsahující lidské sérum nereagující s Rickettsiemi v základním ředění 1:64.

IgM DIL**IgM sample diluent , 15 mL**

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

MM**mounting medium, 1 ml**

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

BUF WASH PBS**PBS, prášek pro 1 litr**

Přidejte obsah sáčku do 1 litru redestilované vody, získáte tak 1 liter PBS pufru pH 7.2.

UPOZORNĚNÍ

Kontrolní séra byla sice vyšetřena na přítomnost infekčních agens pomocí testovacích metod schválených FDA. Žádný z testů ale 100% 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 tato skla za potenciálně infekční a podle toho s nimi zacházejte.

UCHOVÁVÁNÍ A SKLADOVÁNÍ

Souprava musí být uchovávána při 2-8 °C. Před otevřením soupravy nechte všechny komponenty vytemperovat na laboratorní teplotu (20-25°C).

SBĚR VZORKŮ

Separujte sérum ze sražené krve centrifugací a uložte jej ve sterilních nádobkách při 2-8 °C. Pokud testujete vzorky po více jak 5 dnech, zamrazte séra při -20 °C. Akutní séra by měla být odebrána při nástupu onemocnění, konvalescentní séra pak v intervalech 2 a 4 týdny kvůli kontrole změny titru.

METODIKA**Dodávaný materiál**

Souprava obsahuje dostatek reagensů pro 120 stanovení.

Potřebný ale nedodávaný materiál

- destilovaná nebo deionizovaná voda
- čistá 1 l láhev na PBS
- promývací lázeň s držákem skliček
- testovací zkumavky nebo mikrotitrační destička pro ředění séra
- přesná pipeta 10 ul
- 24x50 mm krycí sklička
- fluorescenční mikroskop s filtry (ex. 490nm, em. 530 nm) a zvětšením 400x
- 37 °C vodní lázeň nebo inkubátor
- vlhká komůrka pr inkubaci skliček

Upozornění

- V žádném případě nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
- Konjugát je fotosenzitivní a je balen v ochranném obalu. Uchovávejte jej proto ve tmě a vračejte jej do tmy co nejdříve po použití.
- Tekuté komponenty soupravy obsahují 0,01% THIMEROSALU jako konzervans. **NEPOŽÍVEJTE.**
- Konjugát obsahuje Evansovu modř, která může být karcinogenní. Vyvarujte se styku s kůží.

PŘÍPRAVA VZORKŮ A REAGENCIÍ

1. **Příprava promývacího pufru** přidejte obsah PBS sáčku do 1 litru redestilované vody a pečlivě promíchejte.
2. **Připravte první ředění** 1:16 pro všechna patientská séra v IgM Sample Diluent. Dobře promíchejte a nechte stát alespoň 5 minut pro vysrážení agregátů. Tento krok udělejte v jiné mikrotitrační destičce nebo ve zkumavkách

Připravte další ředění směsí z kroku 1. Nařeďte tyto směsi 1:4 v PBS pro získání konečného ředění 1:64.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Dvounásobným ředěním si připravte serii pozitivních kontrol (řadí se promývacím pufrům) zahrnující 1 ředění nad a 2 ředění pod koncový titr (1:512). Všechny kontroly v soupravě jsou dodávány v základním ředění 1:64.

Poznámka: ze základního ředění pozitivní kontroly 1:64 (1) si připravte sériové ředění do 1:16 (tj. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Dostanete tak konečná ředění 1:128, 1:256, 1:512 a 1:1024 pro semikvantitativní stanovení konečného titru IgM protilátek.

2. řipravte pracovní ředění vzorků 1:64.
Poznámka: Pokud došetřujete pozitivní séra z přechozích testů připravte si jejich sériové ředění v PBS, začínající titrem 1:64.
3. Od každého ředění séra dejte 10 µl do jamky a označte si umístění vzorku pro jeho pozdější vyhodnocení. Pro každý běh stanovení použijte ředění pozitivní kontroly připravené podle bodu 1 a také negativní kontrolu. Vzorky by měly být aplikovány do horního nebo dolního oblouku jamky, vyhněte se dávkování do střední části obsahující mikroskvrny antigenu.
4. Umístěte sklička do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37± 0.5°C.
5. Vyměte vlhkou komůrku z inkubátoru. Připravte si konjugát. Promyjte skla jemným proudem PBS z promývací láhve 3x. Dovolte roztoku PBS zůstat v jamkách alespoň 5 minut.
6. Vytřepněte zbytky PBS z jamek a pokračujte okamžitě dalším krokem. Nenechte jamky vyschnout..
7. Do každé jamky přidejte 1 kapku (10 µl) IgM konjugátu a umístěte sklička zpět do vlhké komůrky. Inkubujte 30 minut při 37± 0.5°C. Inkubace musí probíhat v temnu, ochráňte tak fotosenzitivní konjugát.
8. Promyjte skla jako v bodech 5 a 6.
9. Přidejte 2-3 kapky mouting média na každé sklo a přiklopte je krycím skličkem.
10. Odečtete nabarvená substrátová skla při 400 násobném zvětšení, porovnejte každou jamku s intenzitou záření pozitivní a negativní kontroly. Skla se mohou uchovávat při 2-8°C a ve tmě po dobu 24 hodin.

KONTROLA KVALITY

Negativní kontrola a série ředění pozitivní kontroly musí být zařazeny do každého běhu vyšetření. Negativní kontrola je příkladem pro nereaktivní séra (negativní výsledek), vyznačuje se jednotným červeným zbarvením kontrastním barvivem nebo jemným ale uniformním zeleným zbarvením. Jamka pozitivní kontroly by měla mít konečný titr mezi 1:256 a 1:1024. Intenzita fluorescence při ředění 1:512 může být použita jako cut-off hranice pro vzorky pacientů, označené jako pozitivní. Pokud nějaká z kontrol nereaguje tak jak je popsáno výše, analýza by měla být prohlášena za neplatnou, reagentie a pracovní postup musí být překontrolovány a celá analýza musí být zopakována.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

V případě pozitivní reakce jsou v zorném poli vidět jasně zářící (nejméně na 1+) krátké zelené tyčkovité útvary uvnitř cytoplazmy 10-20% infikovaných buněk. Velikost, vzhled a intenzita reakce každého pole musí být vždy porovnána s reakcí pozitivní a negativní kontroly.

Reakce jiného vzhledu než dává pozitivní kontrola musí být označeny jako nespecifická reakce.

Primární infekce je charakterizována rychlým vzestupem titru u obou tříd (IgG a IgM) protilátek. Hladiny IgM protilátek dosáhnou vrcholu přibližně 3 týdny po nástupu symptomů a zůstávají detekovatelné přibližně 2-3 měsíce. Hladiny IgG protilátek dosáhnou vrcholu asi za 7-12 týdnů, ale klesají mnohem pomaleji než IgM protilátky a přetrvávají přibližně 12 měsíců.

VZORKY PACIENTŮ

Pozitivní ve screeningovém ředění 1:64: IgM titry 1:64 a vyšší jsou považovány za průkaz nedávné infekce způsobené *Rickettsia* spp. Séra pozitivní ve screeningovém ředění 1:64 by se měla dále testovat až do určení konečného titru kvůli pozdějšímu srovnání se vzorky od stejného pacienta odebranými dříve nebo později

Negativní v titru 1:64: Zaznamenejte jako negativní na protilátky proti *Rickettsia*. Další vzorek je vhodné vyšetřit v případě, kdy sérum bylo odebráno ihned po nástupu symptomů, hlavně pokud byla zahájena antibiotická léčba.

Pozitivní v ředění 1:128 a vyšším. Vzorky dávající takovéto zvýšené titry ukazují na nedávnou nebo aktivní infekci. Zvýšené IgM titry jsou také indikátorem vracející se infekce.

Párová séra: Čtyřnásobný vzestup titru mezi akutním a konvalescentním sérem je pokládán za silný příznak nedávné infekce.

OMEZENÍ

- Pro diagnostiku riketsiových infekcí u novorozenců by se měly testovat IgM protilátky, neboť IgG protilátky mohou být mateřského původu.
- Jsou pozorovány zkřížené reaktivity mezi R. skupiny skvrnitě horečky, kam patří druhy *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. helvetica*, *R. slovaca*, *R. massilliae*, *R. africae* a mnoho dalších.
- Zkřížená reaktivita R. mezi skupinami skvrnitě horečky a tyfově horečky je mnohem méně zřetelná a titry jsou 8-32 x nižší než byly stanoveny uvnitř těchto skupin.
- *Rickettsia felis* může být při dedekci riketsii skupiny skvrnitě horečky, také náhodně detekována. Prosím podívejte se do katalogu na *R. Felis* – specific assays.

DISTRIBUTOR:

LABOSERV s.r.o.
Hudcova 532/78b
612 00 Brno
T: 541243113, F: 541243114
E: laboserv@laboserv.cz
<http://www.laboserv.cz>