

## ISTRUZIONI PER L'USO

### Kit IFA per anticorpi IgM Rickettsia Screen

Numero di catalogo:	R21M-120
Quantità:	120 test
Conservazione:	2-8°C

Test in immunofluorescenza indiretta per la rivelazione e la determinazione semiquantitativa di anticorpi della classe IgM contro entrambi i gruppi Rickettsia, gruppo della febbre maculare e gruppo della febbre tifoidea, 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  
www.fullerlabs.com



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

### USO PREVISTO

Il kit IFA per anticorpi IgM anti-Rickettsia è destinato alla simultanea rivelazione e determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgM di entrambi i gruppi Rickettsia, gruppo della febbre maculare e della febbre tifoidea, ed è usato quale sussidio per la diagnosi dell'infezione umana da parte di questi agenti patogeni.

### COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I Rickettsia del gruppo della febbre maculare vengono trovati in tutto il mondo e sono trasmessi/mediati dalle zecche e dagli acari (*Rickettsia akari*) i cui morsi trasferiscono l'infezione; i ***Rickettsia rickettsii*** vengono trovati in tutto l'emisfero ovest mentre i ***Rickettsia conorii*** (febbre bottonosa) vengono trovati in tutta la regione Mediterranea, Africa, India e nella maggior parte dell'Asia. Molte altre specie di Rickettsia del gruppo della febbre maculare vengo trovate in ampie aree.

I Rickettsia del gruppo della febbre tifoidea sono trasmessi da pulci e pidocchi infetti. Questo gruppo comprende i ***Rickettsia typhi*** (tifo endemico) e i ***Rickettsia prowazekii*** (tifo epidemico) entrambe le specie vengono trovate in tutto il mondo. L'infezione provocata da questi patogeni induce una specifica risposta anticorpale che, può essere rivelata ed usata quale mezzo indiretto di identificazione di un individuo infetto.

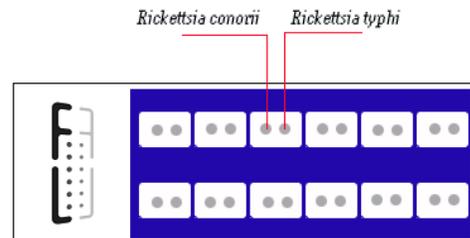
I vetrini usati in questo kit utilizzano entrambi *Rickettsia conorii* e *Rickettsia typhi* purificati come substrato antigenico in ciascun pozzetto. Il siero del paziente, opportunamente diluito almeno 1:64 con tampone PBS, viene incubato per permettere la reazione degli anticorpi del paziente con i Rickettsia purificati. Il vetrino viene lavato per eliminare quanto non ha reagito; sui pozzetti del vetrino viene aggiunto il coniugato anti-umano marcato DyLight 488 specifico 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 è identificabile con fluorescenza chiaramente definita di colore verde mela delle forme a bastoncino in una matrice di sfondo rossastra. In una reazione negativa si vedono le cellule di colore rossastro o una fluorescenza non specifica diversa da quella riscontrata nel controllo positivo. Campioni con reazione positiva possono essere rieseguiti a più alte diluizioni onde determinare la più alta diluizione reattiva o titolo finale.

### REAGENTI E MATERIALI FORNITI

**IFA Ag x 12**

**Vetrini con substrato (10)**

10 x 12- pozzetti, vetrini contenenti in ciascun pozzetto i due antigeni fissati in acetone.



**CONJ FITC**

**Coniugato per IgM, 2.5 mL**

Flacone con contagocce, tappo giallo, contenente coniugato antiumano IgM (Fc) coniugato DyLight 488 ed anti-topo IgG (Fc) coniugato FITC con albumina bovina serica e contrastante blue Evans.

**CONT +****Gruppo della febbre maculare  
Controllo Positivo, 0.5 mL**

Flacone con contagocce, tappo blu, contenente anticorpi monoclonali di topo reattivo contro *Rickettsia* gruppo della febbre maculare alla diluizione di screening 1:64 con titolo ad end-point 1:512.

**CONT +****Gruppo della febbre tifoidea  
Controllo Positivo, 0.5 mL**

Flacone con contagocce, tappo verde, contenente anticorpi monoclonali di topo reattivo contro *Rickettsia* Gruppo della febbre tifoidea alla diluizione di screening 1:64 con titolo ad end-point 1:512.

**CONT -****Controllo Negativo, 0.5 mL**

Flacone con contagocce, tappo rosso, contenente siero umano non reattivo alla diluizione di 1:64 diluizione di screening.

**MM****Tampone di Montaggio, 1 mL**

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

**BUF WASH PBS****PBS, 1 litro**

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

**PRECAUZIONI E AVVERTENZE**

I sieri di controllo sono stati analizzati secondo le procedure richieste da USFDA e trovati non reattivi per agenti infettivi. Nessun test può comunque offrire garanzia che siano assenti agenti infettivi; perciò, questi reattivi così come i campioni biologici di origine umana devono considerarsi potenzialmente infetti e come tali trattati e manipolati secondo la buona pratica di laboratorio, evitarne il contatto con la pelle o l'ingestione. I vetrini substrato sono stati preparati con antigeni chimicamente inattivati ma 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.

**Prelievo e preparazione dei campioni**

Attendere che i campioni di sangue coagulino e separare il siero per centrifugazione. Trasferire il siero asetticamente in contenitori sterili richiudibili. Conservare tra 2-8°C. Se i campioni devono essere conservati per più di 5 giorni congelarli a -20°C o a temperatura inferiore. Per verificare la sierconversione, prelevare i campioni in fase acuta e in fase convalescente a 2 e 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
- Vaschetta di lavaggio con rack portavetrini
- 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 vetrini

**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.
- I componenti liquidi contengono 0,01% di thimerosal come conservante, non ingerire.
- Il coniugato contiene blue Evans che può essere cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle.

**PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEI REAGENTI**

1. **Tampone di lavaggio** prepararlo aggiungendo il contenuto di una bustina ad 1 litro di acqua distillata, miscelare accuratamente.
2. **Campioni diluizione 1:64** prepararle diluendo i sieri dei pazienti con il tampone di lavaggio come diluente.

**PROCEDIMENTO**

1. Per il Controllo Positivo preparare diluizioni in PBS che includano una diluizione sopra ed una sotto di quella riportata come end-point (1:512). Tutti i controlli sono confezionati con prediluizione 1:64.
2. 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 1, dispensare inoltre in un pozzetto (10 µL) di controllo negativo tal quale. I campioni dovrebbero essere depositati all'estremità, superiore o inferiore, del pozzetto evitando la sezione centrale dove sono fissati i substrati antigenici.
3. Riporre i vetrini in camera umida per 30 minuti a 37±0.5°C
4. 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.
5. 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 4-5.
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 colorato ad ingrandimento 400X. Comparare ogni pozzetto con quanto osservato, sia come apparenza che come intensità, 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, assenza della caratteristica e distinta colorazione dei rickettsia. I pozzetti del Controllo Positivo dovrebbero dare un titolo ad end-point 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 ciascuno dei 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.

Oltre all'uso giornaliero dei controlli inclusi nel kit sarebbe opportuno usare un siero umano, controllo interno, IgM positivo. Visto l'uso di anticorpi monoclonali nei controlli inclusi nel kit, dovuto alla carenza nel reperire donatori con sieri in fase acuta, è d'obbligo per il laboratorio avere e conservare un siero umano positivo per verificare l'efficacia del coniugato IgM.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una reazione positiva appare come una luminosa colorazione (minimo 1+) delle corte forme pleomorfe a bastoncino. La dimensione, l'apparenza e la densità delle cellule infette deve essere confrontata con la reazione ottenuta per il Controllo Positivo e Negativo. Morfologie e reattività differenti da quelle osservate nel controllo positivo devono essere considerate non-specifiche.

L'infezione primaria è caratterizzata da un'immediata salita degli anticorpi di classe IgG ed IgM. Il picco massimo di risposta degli anticorpi di classe IgM avviene dopo 3 settimane dall'instaurarsi dell'infezione e rimangono rilevabili per due-tre mesi. Il raggiungimento del picco massimo di risposta degli anticorpi di classe IgG avviene in 7-12 settimane, declina molto più lentamente dei livelli degli anticorpi di classe IgM e rimangono elevati per circa 12 mesi.

## CAMPIONI DI SIERO

**Positivo a 1:64:** Titoli di IgM 1:64 e maggiori indicano un'infezione recente. I sieri positivi dovrebbero essere titolati onde ottenere il valore di end-point per comparazione con valori precedenti o successivi dello stesso paziente.

**Negativo a 1:64:** Viene considerato negativo. Se il prelievo è avvenuto immediatamente dopo l'instaurarsi dell'infezione e in particolar modo se era in atto una terapia antibiotica si consiglia un ulteriore prelievo ed analisi.

## LIMITAZIONI

- Nel tentativo di supportare, nei neonati, la diagnosi di infezione da Rickettsia si dovrebbe eseguire solo il test IgM in quanto gli anticorpi di classe IgG potrebbero essere di origine materna.
- Nelle procedure IFA è stata notata un'elevata reazione crociata tra membri del gruppo della febbre maculata comprendente le specie conorii, rickettsii, akari, parkeri, sibirica e altre. Nelle procedure IFA vi è anche un'elevata reazione crociata all'interno del gruppo della febbre tifoidea il quale include le specie typhi e prowazekii.
- Una reazione crociata tra il gruppo della febbre maculata e quello della febbre tifoidea è molto meno evidente, sono stati osservati titoli da 8 a 32 volte più bassi di quelli del gruppo antigenico infettante.
- Rickettsia felis appartiene al gruppo della febbre maculata ma raramente viene rilevata con questo kit, vedere catalogo per kit specifico Rickettsia felis.