

GEBRAUCHSANLEITUNG

Rickettsia conorii IFA IgG Antikörper Kit

Bestellnummer:	RCG-120
Format:	120 test
Aufbewahrung	2-8°C

Ein indirecter Immunfluoreszenztest zum Nachweis humaner IgG Antikörper gegen *Rickettsia conorii*

In-vitro-Diagnostikum



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 – Frankreich

VERWENDUNGSZWECK

Der *Rickettsia conorii* Immunfluoreszenz-Antikörper IFA IgG Test ist zum semi-quantitativen Nachweis humaner IgG-Antikörper gegen *Rickettsia conorii* und soll die Diagnose menschlicher Infektionen durch diese Krankheitserreger unterstützen

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Rickettsia conorii kommen in der Mittelmeerregion, im Indien und im Afrika vor und werden von Zecken übertragen, durch deren Biss eine ursprünglich von den natürlicheren Wirten dieser Organismen (Hunde und Nagetiere) stammende Infektion übertragen wird. Bei der anschließenden Infektion kommt es zu einer spezifischen Antikörperreaktion, die nachgewiesen und als indirektes Mittel zur Identifizierung von infizierten Personen genutzt werden kann. Der IFA Test verwendet *Rickettsia conorii*-angesteckte Vero Zellen.

Verdünnungen des geduldigen Serums werden mit *Rickettsia conorii* in jedem Diabrunnen reagiert. Nachdem man, zum der ohne Reaktion Serumproteine zu entfernen gewaschen hat, wird die spezifische Reaktion mit Kategorie-spezifischem DyLight 488-Konjugat des Immunoglobulins beschriftet. Die resultierenden Reaktionen werden mit Standard-fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht, in der eine positive Reaktion gesehen wird, wie scharf definierte apfelgrüne Leuchtstoffstange bildet sich im Zytoplasma der angesteckten Zellen. Eine negative Reaktion wird entweder als keine Fluoreszenz oder Fluoreszenz gesehen, die verschieden ist, die gesehen in die Positive Kontrolle hervorquillt. Solche positive Reaktionen können an den höheren Verdünnungen dann erneut getestet werden, um die höchste reagierende oder Endpunktverdünnung festzustellen.

INHALT DES TESTBESTECKS

IFA Ag x 12

Substratobjektträger (10)

Zehn Objektträger mit jeweils zwölf Reactionfeldern, die das Azeton-lokal enthalten, reparierten die Vero Zellen, die mit *Rickettsia conorii* angesteckt wurden, verpackten unter Vakuum

CONJ FITC

IgG Konjugat, 2.5 mL

Tropferflasche mit gelbem Verschluss enthält s Anti-Human-IgG-DyLight 488 Konjugat in proteinhaltiger Pufferlösung, mit Evans Blau Gegenfärbung.

CONT +

Positive Kontrolle, 0.5 mL

Tropferflasche mit blauem Verschluss enthält vorbehandeltes reactives gebrauchsfertig Humaneserum, bei 1:64 Abschirmungs-verdünnung.

CONT -

Negative Kontrolle, 0.5 mL

Tropferflasche mit rotem Verschluss enthält vorbehandeltes nicht-reactives Humaneserum, bei 1:64 Abschirmungsverdünnung.

MM

Eindeckmedium, 1 mL

Tropferflasche mit weißem Verschluss enthält 50% Glycerol in PBS

BUF WASH PBS

PBS, 1 liter

Fügen Sie 1 Litern geliefertes Pulver hinzu, reinigte Wasser, um gepuffert bei pH-Wert 7.2 zu produzieren

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) 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 Emissions-Wellenlänge 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.

Vorbereitung der Proben und Reagenzien

1. Objektträger und Kronrollen aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen. Folie an der Seite einreißeb, Objektträger entnehmen und Mattfeld beschriften.

2. Patientenserum 1:64 mit PBS verdünnen.

3. Der Positiv-Kontrolle und Gegebenfalls mit PBS weitertitrieren. Bereiten Sie Verdünnungen der Positiv-Kontrolle bei 1:256, 1:512 und 1:1024 vor. Bemerken Sie, daß diese Kontrollen bei 1:64 Verdünnungen abgefüllt werden.

ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents and sera to reach ambient temperature before starting timed assay procedure.

1. 10µL der gebrauchsfertigen **Negativkontrolle** auf das vorgesehene Reaktionsfeld geben. Negativkontrolle nicht verdünnen.

2. 10µL der **Positivkontrolle** unverdünnt auf das vorgesehene Reaktionsfeld geben. Zur seriellen 16-fachen Verdünnung der Positivkontrolle **PBS** verwenden und davon jeweils 10 µL auf die vorgesehenen Reaktionsfelder geben

3. 10µL der **verdünnten Serumproben** (siehe Vorbereitung der Proben und Reagenzien, oben) auf die vorgesehenen Reaktionsfelder geben. Zur besseren Identifikation beim Ablesen der Ergebnisse Auftragsreihenfolge markieren

4. Objektträger in einer feuchten Kammer für 30 ± 2 Minuten bei +37°± 0,5°C inkubieren.

5. Feuchte Kammer aus Inkubator oder Wasserbad entnehmen. Auftragstellen des Objektträgers vorsichtig 4x mit einem sanften Strahl PBS aus der Waschflasche abspülen, Objektträger über einer Spüle vorsichtig ausschütteln, um restlichen Puffer zu entfernen.

6. Lassen Sie Tropfen des PBS auf den Objektträger für 5 Minuten vor abschließendem Spülen bleiben.

7. Auf jede Auftragstelle 10 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.

8. Objektträger wie in Schritt 5 beschrieben waschen, anschließend 2-3 Tropfen Eindeckmedium auf jeden Objektträger geben und mit Deckgläschen versehen..

9. Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung ablesen, dabei jede Auftragstelle in ihrer Farbintensität mit dem Erscheinungsbild der Positiv- und Negativkontrollen vergleichen. 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, das bei Auswertung eine gleichmäßige rote Gegenfärbung aufweist. Die Positivkontrolle sollte einen Endtiter innerhalb der zweifachen Verdünnung des im Abschnitt „Reagenzien und im Lieferumfang enthaltene 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.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Eine positive Reaktion scheint, wie das helle Beflecken (mindestens 1+) scharf definierte apfelgrüne Leuchtstoffstange bildet sich im Zytoplasma der angesteckten Zellen.. Die Teilchengröße, das Aussehen und die Dichte der Felder müssen mit Reaktionen den Positive- und Negative Kontrolle verglichen werden. Die Muster der Reaktivität unterschiedlich als das, das in die Positive Kontrolle gesehen wird, müssen als unspezifisch gelten.

Eine frische Infektion ist charakterisiert durch einen schnellen Anstieg von IgG und IgM Antikörpern im Immunfluoreszenztest. IgM Antikörper erreichen ein Maximum etwa 3 Wochen nach Einsetzen der Symptome und bleiben für 2 bis 3 Monate nachweisbar. IgG Antikörper erreichen ein Maximum nach 7 – 12 Wochen, gehen sehr viel langsamer zurück als IgM Antikörper und bleiben erhöht für etwa 12 Monate

PATIENTENPROBEN ERGEBNISSE

Positiv bei 1:64 Screening-Verdünnung : IgG Titer von 1:64 und grösseres reflektiert Infektion zu einer unbestimmten Zeit (seropositiv). Positive Seren sollten wieder laufen gelassen werden, um ihren Endpunkttiter für Vergleich mit den früheren oder neueren Probestücken vom gleichen Patienten festzustellen.

Negativ bei 1:64 Verdünnung: Als negativ für *Rickettsia conorii* IgG Antikörper bewerten. Weitere Serumproben sollten entnommen werden, wenn die Entnahme der ursprünglichen Probe unmittelbar nach Einsetzen der Symptome erfolgte.

EINSCHRÄNKUNGEN

Dieses Verfahren dient zum Nachweis von gruppenspezifischen Antikörpern und kann daher nicht zwischen einzelnen Angehörigen Fleckfieber-Gruppe differenzieren. Reaktivität auf die Typhus-Gruppe oder Scrub-Typhus wird im Allgemeinen nicht nachgewiesen.

ZU ERWARTENDE BEFUNDE

Das Vorherrschen der spezifischen Antikörper verändert das Abhängen nach der geographischen Region und der Bevölkerung, die geprüft wird.

SPEZIFISCHE TESTEIGENSCHAFTEN

Die Testspezifität wurde durch Testung von Stichproben aus nicht endemischen Gebieten und durch Testung von Proben verwandter Erkrankungen ermittelt. 120 Seren aus Südkalifornien und 4 Seren mit Antikörpern gegen Coxiella burnetii waren alle IgG < 1:64 (negativ). Siehe auch unter Einschränkungen nach der Kreuzreaktivität mit anderen Rickettsien aus der Fleckfieber Gruppe.

Da keine klinischen Proben aus dem Mittelmeergebiet zur Verfügung standen, wurde die Empfindlichkeit mit Seren aus Nordamerika und eng verwandten Rickettsia rickettsii bestimmt. Von 17 Seren, IgG positiv für R rickettsii mit IFT, waren alle auch positiv in diesem Test mit R. conorii als Antigen im IFT (innerhalb von zwei Verdünnungsstufen). 12 Seren aus Südeuropa mit IgG Reaktivität gegen Fleckfieber Rickettsien reagierten auch positiv mit diesem Rickettsia conorii IFT.

Current Revision D 1/04