

Návod k použití

Souprava pro imunofluorescenční detekci IgG protilátek proti *Rickettsia rickettsii*

Katalogové číslo: RRG-120

Velikost: 120 test

Uchovávání: 2-8°C

Nepřímá imunofluorescenční imunoanalýza pro detekci IgG třídy protilátek proti *Rickettsia rickettsii* v lidském séru a plazmě.

Pouze pro diagnostiku *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
www.fullerlabs.com

EC REP

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

Zamýšlené použití

Tato souprava je určena pro detekci a semikvantifikaci IgG třídy protilátek proti *Rickettsia rickettsii*, jako pomoc při diagnostice lidské infekce způsobené tímto patogenem.

Shrnutí a vysvětlení testu

Rickettsia rickettsii se obvykle nachází ve Středozeří, Indii a Africe. Lidská infekce nazývaná středomořská či marseilleská horečka nebo boutonneuse je přenášena klíšťaty. Jejich kousnutím se infekce dostane z přírodního rezervoáru (pes, hlodavci). Následná infekce indukuje specifickou protilátkovou odpověď, která může být detekována a použita jako nepřímý průkaz infekce člověka

Na IFA skličkách je navázán antigen *Rickettsia rickettsii* z buněčných kultur. Pacientská séra jsou ředěna nejméně 1:64 v PBS a inkubována v jednotlivých jamkách, čímž se umožní reakce sérová protilátka-intracelulární rickettsia. Sklička jsou potom promyta kvůli odstranění nezreagovaných sérových proteinů, a přidá se značený konjugát. Po inkubaci se skla znovu promyjí, aby se odstranil nezreagovaný konjugát. Výsledky reakce jsou vizualizovány použitím standardního fluorescenčního mikroskopu, kde pozitivní reakce vypadá jako ostře ohraničené zelené fluorescenční tyčinkovité útvary v cytoplazmě infikovaných buněk. Takto pozitivní reakce se může dále testovat ve vyšších ředěních k určení konečného titru. Negativní reakce vypadá buďto jako buňky červeně zbarvené kontrastním barvivem, nebo fluorescence zcela odlišná od pozitivní kontroly.

Reagencie

IFA Ag x 12

Substrátová skla (10)

10 X 12-jamková skla obsahují acetonem fixované Vero buňky, z nichž některé jsou infikované marockým kmenem *Rickettsia rickettsii* (chemicky usmrceným).

CONJ FITC

Konjugát, 2.5 mL

Kapací lahvička se žlutým víčkem obsahující afinitně purifikovaný DyLight 488 značené kozí antilidské IgG (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 1:64 s konečným titrem 1:512.

CONT -

Negativní kontrola, 0.5 mL

Kapací lahvička s červeným víčkem obsahující nereaktivní lidské sérum ve screeningovém ředění 1:64.

MM

Montovací médium, 1 mL

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

BUF WASH PBS

PBS, 1 litr

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 reagensiemi 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 reagensií pro 120 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

Všechny reagensie a séra nechejte před vlastním testováním vytemperovat na pokojovou teplotu!

1. Připravte screeningové ředění 1:64 pro všechna séra pacientů. Pro pozitivní séra z přechozích testů připravte sériové ředění v PBS, začínající titrem 1:64.

2. Připravte ředění pozitivní kontroly, která je dodávána ve screeningovém ředění 1:64. Připravte sériové ředění do 1:16 (tj. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Tato ředění jsou považována za 1:128, 1:256. 1:512 and 1:1024 pro určení konečného titru.

3. Pro každé naředěné sérum přidejte 10 µL na jednu jamku a vyznačte si polohu pro pozdější vyhodnocení. Pro každý test vyšetřete negativní i pozitivní kontrolu.

4. Umístěte sklička do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37°± 0.5°C.

5. Vyjměte vlhkou komůrku z inkubátoru. Připravte si konjugát. Promyjte skla jemným proudem PBS z promývací lahve. Vytřepte zbytek PBS ze sklíček a osušte. Opakujte tento postup 3x.

6. Vytřepajte zbytky PBS z jamek, ale nenechejte je vyschnout.

7. Do každé jamky přidej 1 kapku (10-15 µl) konjugátu a potom dejte skla zpět do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37°± 0.5°C. Inkubace by měla probíhat potmě abyste ochránili fotosenzitivní konjugát

8. Promyjte skla dle bodu 5-6.

9. Přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé sklo a umístěte na ně krycí sklo. Opatrně odstraňte případné vzduchové bublinky.

10. Odečtete nabarvená substrátová skla při 400 násobném zvětšení, porovnejte každou jamku s intenzitou záření pozitivní a negativní kontroly. Skla se uchovávají při 2-8°C potmě po dobu 24 hodin.

KONTROLA KVALITY

Negativní kontrolní sérum a naředěné pozitivní kontrolní sérum by se mělo vyšetřovat každý den. Negativní kontrola je příklad nereaktivního séra, které se vyznačuje 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 by měla být použita jako cut-off hodnota pro vzorky pacientů, kteří jsou pozitivní. Pokud žádná z kontrol nereaguje tak jak je popsáno, analýza by měla být zrušena, reagensie 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, shodné se zářením pozitivní kontroly, došlo k chybě v pracovním postupu a celou analýzu je třeba zopakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pozitivní reakce vypadá jako jasně zářící (alespoň na 1 +) zelené tyčkovité útvary uvnitř cytoplazmy u 10-20 % infikovaných buněk v zorném poli. Velikost, vzhled a intenzita reakce musí být vždy porovnána s pozitivní a negativní kontrolou. Reaktivní buňky jiného vzhledu než má pozitivní kontrola musí být označeny jako nespecifická reakce.

Primární (počínající) infekce je charakterizována rychlým vzestupem u obou tříd 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: IgG tiry 1:64 a vyšší označují infekci v blíže neurčeném čase (séropozitivní). 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 1:64: Zaznamenejte jako negativní na protilátky proti *R. rickettsii*. Další vzorek je vhodné vyšetřit v případe, kdy sérum bylo odebráno ihned po nástupu symptomů, hlavně pokud byla zahájena antibiotická léčba.

Párová séra: Čtyřnásobný vzestup titru mezi akutním a rekonvalescentním sérem naznačuje nedávnou infekci

LIMITACE

- Pro diagnostiku riketsiových infekcí u novorozenců by se měly testovat IgM protilátky, protože protilátky IgG mohou pocházet od matky.

- Je pozorována značná zkřížená reaktivita mezi členy skupiny skvrnité horečky, kam patří druhy *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. helvetica*, *R. slovak*a, *R. massiliae*, *R. africae* a mnoho dalších. Zkřížená reaktivita se skupinou tyfové horečky je mnohem méně jasná, s titry 8-32 násobně nižšími než jsou u infekčního agens.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Rozšíření specifických protilátek závisí na geografickém regionu a testované populaci. Endemické oblasti mohou vykazovat seropozitivitu 7-26%, některé případy byly ale velmi slabě pozitivní nebo bezpříznakové. Specifické IgG protilátkové titry 1:128 a vyšší jsou neobvyklé a znamenají aktivní nebo nedávnou infekci. IgM specifické titry se u neinfikované zdravé populace nevyskytují.

Charakteristika provedení

Specifičnost testu byla určena testováním náhodných sér z neendemických oblastí a sér s odpovídajícím onemocněním. 120 testovaných sér z Kalifornie bylo negativních tj. <1:64 a 4 séra měla protilátky proti *Coxiella burnetii*. Podívejte se také do kapitoly Limitace kde je popsána zkřížená reaktivita s ostatními členy skupiny skvrnité horečky.

Díky nedostatku klinických sér z oblasti Středozeemí, byla citlivost odhadnuta pomocí vzorků ze Severní Ameriky reaktivních s blizce příbuznou *R. rickettsii*. Mimo 63 sér pozitivních na *R. rickettsii* IFA testem, byla v tomto testu všechna séra pozitivní +/- 2 ředění na *R. rickettsii*. Z 16 sér získaných z jižní Evropy a pozitivních na riketsie skupiny skvrnité horečky bylo všech 16 reaktivních.

Current Revision D 1/04