

GEBRAUCHSANLEITUNG

Rickettsia typhi IFA IgG Antikörper Kit

| | |
|----------------|----------|
| Bestellnummer: | RTG-120 |
| Format: | 120 test |
| Aufbewahrung | 2-8°C |

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

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
www.fullerlabs.com



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

VERWENDUNGSZWECK

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

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Rickettsia typhi kommen weltweit vor und werden im Kot infizierter Flöhe übertragen. 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 typhi*-angesteckte Vero Zellen.

Verdünnungen des geduldigen Serums werden mit *Rickettsia typhi* 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 Immunglobulins 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 typhi* 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 Puffer-lösung, mit Evans Blau Gegenfärbung.

CONT +

Positive Kontrolle, 0.5 mL

Tropferflasche mit blauem Verschluss enthält reactives gebrauchsfertig Humanserum, bei 1:64 Abschirmungsverdünnung.

CONT -

Negative Kontrolle, 0.5 mL

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

MM

Eindeckmedium, 1 mL

Tropferflasche mit weißem Verschluss enthält 50% Ölsüß 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

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HCV, HbsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Objektträgern sind mit chemische desaktivierten Antigenen bereit. Die Objektträgern sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Dieser Kit ist lediglich zum in-vitro-Gebrauch bestimmt.

- Einige der Reagenzien enthalten al Konservierungsmittel Thimerosal, deshalb ist ein Verschlucken und Berühren mit der Haut zu vermeiden.
- Benutzen Sie keine Bestandteile jenseits der Gültigkeitsdaten.
- Konjugat ist lichtempfindlich und wird in undurchsichtige Plastik abgefüllt. Lad in der Dunkelheit und der Rückkehr zu Lagerung nach der Verwendung.
- Konjugat enthält Evans' Blaufarbstoff, der vielleicht krebserrgend ist. Vermaiden Sie Kontakt mit Haut.

Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Die Reagenzien bei 2–8°C lagern. Die Haltbarkeit ist für alle Reagenzien den Etiketten zu entnehmen. Nicht verwendete Objektträgern sollten dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2–8°C gelagert werden. Die Beschichtung ist unter diesen Lagerbedingungen für 2 Monate stabil.

Vor Gebrauch sind die Reagenzien auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) zu bringen und sorgfältig zu mischen. Für das Pipettieren sind Pipettenspitzen aus Kunststoff zu verwenden.

PROBENGEWINNUNG UND AUFBEWAHRUNG

Es ist keine besondere Probenvorbehandlung erforderlich. Serum- bzw. Plasmaproben (EDTA, Heparin) können verwendet werden. Die Proben können 5 Tage bei 2–8°C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei –20°C einfrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen in vermeiden! Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Votex) werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Genügende Materialien werden für 120 Entschlossenheiten geliefert.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel (nicht im Kit enthalten):

- Aqua dest.
- Wäschenflaschen für PBS
- Präzisionspipetten
- Bereitstellung von Reagengläsern zur Serenverdünnung
- 24 x 50 mm Deckgläschen
- Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (maximal Begeisterungswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 530 nm) und 200X Vergrößerung.
- 37°C-Brutschrank
- feuchter Kammer

Precautions

- Alle Komponenten sind stabil bis zum Monatsende des Verfalldatums bei einer Lagerung bei +2 bis +8 °C.
- Testausrüstung und deren Bestandteile nur bis Ablauf des Verfalldatums verwenden.
- Reagenzien während der Lagerung oder Inkubation vor starkem Lichteinfall schützen.
- Die flüssigen Reagenzien enthalten 0,001 % Thimerosal, das bei Verschlucken evtl. toxisch ist

Vorbereitung der Proben und Reagenzien

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

- Patientenserum 1:64 mit PBS verdünnen.

- 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,

Testdurchführen

- 10 µL verdünnte Patientenserum auf die Antigenfeldern pipettieren.

- Für jede Probenlauf schließt die Negativ-Kontrolle ein, und Verdünnungen der Positiv-Kontrolle bereitetsich ober vor.

- Objektträger in feuchter Kammer für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubieren.

- Objektträger aus der Kammer nehmen. Spülen Sie Objektträger von einer Wäschenflasche mit einem sanften Strom von PBS. Schüttelnflüssigkeit von Objektträger in ein Spülbecken und eine Wiederholung dies spült zwei weitere Male

- Zu jedem Objektträgerfeld fügen 1 Tropfen (10 µL) Konjugat hinzu, bringen Sie dann Objektträger zu feuchter Kammer für 30 Minuten in der Dunkelheit bei 37°C zurück (das lichtempfindliche Konjugat zu schützen).

- Waschen Sie Objektträger wie in Schritt 4, über.

- Fügen Sie jedem Objektträger 2-3 Tropfen von Eindeckmittel hinzu und setzen Sie Deckgläschen darauf.

- Reaktionsfelder bei 400-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen, beim Vergleichen jedes Brunnens mit der visuellen Intensität und dem Aussehen der Positiven und Negativen Kontrollfelder, für jedes Feld. Objektträger werden vielleicht für bis zu 24 Stunden bei 2-8°C in der Dunkelheit gelagert.

- Für optimale Fluoreszenz, die Objektträger am selben Tag untersuchen; ansonsten im Dunkeln bei +2 bis +8 °C aufbewahren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedesmal, wenn ein oder mehrere Objektträger benutzt werden, sollten sowohl Positive als auch Negative Kontrollen enthalten sein. Der Endtiter der Positive Kontrolle sollte bei einer Verdünnung von 1:8 der Lösung in der Flasche liegen. Je nach Laborbedingungen bzw. technischer Ausstattung kann der Endpunkt zwischen einer Verdünnung von 1:4 und 1:16 der Lösung in der Flasche liegen. Die Negative Kontrolle sollte keine Fluoreszenz aufweisen. Weichen die Ergebnisse der Kontrollen von diesen Angaben ab, sollten die Patiententests als ungültig betrachtet und der Test 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

PATIENTENPROBENERGEBNISSE

≥1:64: IgG Titer von 1:64 und größseres 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.

<1: 64: Berichten Sie als Negativ für *Rickettsia typhi* Antikörper. Weitere Serumprobestücke sollten gezeichnet werden, wenn die Vorlage sofort Pfostenangriff von Symptomen genommen wurde, besonders wenn antibiotische Therapie eingeleitet wurde .

EINSCHRÄNKUNGEN

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

LITERATUR

- La Scola, Bernard und Didier Raoult. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 2715 – 2727
- Raoult, Didier und Gregory A. Dasch. J. Clin. Microbiol. 1989; 27: 2073 – 2079.

Revised 7/99