

ISTRUZIONI PER L'USO

Kit EIA per anticorpi IgG anti-*Rickettsia typhi*

Numero di catalogo	RTG-96K
Quantità	96 test (12 x 8-pozzetti)
Conservazione	2-8°C

Un test immunologico enzimatico indiretto per la rilevazione e la determinazione quantitativa della classe di anticorpi IgG contro i *Rickettsia typhi* nel siero o nel plasma umano

Solamente per uso diagnostico in vitro.



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 USA
Tel.: +714 525-7660 • Fax: +714 525-7614
Email: info@fullerlabs.com •
www.fullerlabs.com



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

USO PREVISTO

Il kit EIA per anticorpi IgG anti-*Rickettsia typhi*, destinato alla rilevazione e quantificazione degli anticorpi di classe IgG contro i *Rickettsia typhi*, va usato quale sussidio alla diagnosi dell'infezione umana da parte di questo agente patogeno.

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I *Rickettsia typhi* sono diffusi in tutto il mondo e mediati dalle feci di pulci infetti. Nel caso di questo patogeno, l'infezione induce una specifica risposta anticorpale, che può essere rilevata ed usata quale mezzo indiretto di identificazione di un individuo infetto.

I micropozzetti EIA di questo kit usano antigeni nativi della membrana esterna dei *Rickettsia typhi*. Il siero dei pazienti viene diluito in un tampone per campione ed incubato nei micropozzetti per consentire la reazione degli anticorpi sierici con gli antigeni in fase solida. I pozzetti vengono successivamente lavati per rimuovere le proteine del siero non reagito e viene aggiunto un coniugato di IgG antiumano marcato con enzima, in modo da contrassegnare gli anticorpi legati. Trascorso un periodo di incubazione, i pozzetti vengono lavati un'altra volta per rimuovere il coniugato non reagito. Un substrato enzimatico contenente TMB quale cromogeno (substrato TMB) viene usato per quantificare l'enzima HRP legato. Lo sviluppo del colore blu è proporzionale all'anticorpo specifico. La reazione viene interrotta e stabilizzata per mezzo di una soluzione di arresto che vira il blu al giallo. L'intensità cromatica (adsorbanza), determinata alla lunghezza d'onda di 450 nm, è usata per quantificare la reattività del siero a confronto con i sieri di riferimento.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

MW Ag

Modulo EIA da 96 micropozzetti

12 strisce di 8 micropozzetti rivestiti di antigeni di *Rickettsia typhi*, confezionate con essiccante e pronte per l'uso.

SAMP DIL

Diluyente per campioni, 2 x 50 ml

Tampone PBS contenente albumina di siero bovino e Tween 20 pronte per l'uso

CONJ ENZ

Coniugato enzimatico, 12 ml

IgG caprino antiumano marcato con perossidasi e purificato per affinità (specifico alla catena gamma), pronto per l'uso.

CONT +

Controllo positivo, 120 µl

Il flacone dal tappo blu contiene siero umano non diluito fortemente reattivo ai *Rickettsia typhi*.

CAL ±

Calibratore di esclusione, 200 µl

Il flacone dal tappo verde contiene siero umano non diluito debolmente reattivo ai *Rickettsia typhi*.

CONT -

Controllo negativo, 120 µl

Il flacone dal rosso contiene siero umano non diluito non reattivo ai *Rickettsia typhi*.

SUBS TMB

Substrato TMB, 12 ml

La soluzione, fornita in un flacone color paglierino, contiene H₂O₂ quale substrato e tetrametilbenzidina (TMB). Pronta per l'uso, va protetta contro la luce.

SOLN|STOP**Soluzione di arresto, 12 ml**

Acido solforico diluito pronto per l'uso. Evitare il contatto con la pelle.

BUF WASH PBS**PBS, 1 litro**

Aggiungere la polvere fornita in 1 litro di acqua purificata per produrre un tampone PBS di pH 7,2. (Preparazione dei Campioni e dei Reagenti)

BUF WASH TWEEN**Tween 20, 2 ml**

Per produrre il tampone di lavaggio (Preparazione dei Campioni e dei Reagenti)

Avvertenze

1. I sieri di controllo sono stati soggetti a screening per verificare l'assenza di agenti infettivi con i test richiesti dall'ente statunitense FDA. Visto che nessun metodo di analisi può garantire l'assenza completa di agenti infettivi, questi reagenti, come tutti i sieri e le attrezzature che vengono a contatto con tali campioni, devono essere maneggiati in conformità a prassi sicure di laboratorio, in modo da evitare il contatto con la pelle e l'ingestione.
2. I micropozzetti rivestiti sono preparati con antigeni disattivati. Comunque, devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati di conseguenza.

Maneggio e conservazione

I componenti del kit devono essere conservati a 2-8°C. Vanno portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di aprire i flaconi e la busta delle piastre. Ai fini della conservazione, richiudere bene le strisce di test inutilizzate assieme all'essiccante.

PRELIEVO DEI CAMPIONI

Lasciar coagulare il campione ematico e separare il siero tramite centrifugazione. Trasferire il siero asetticamente in un contenitore a chiusura ermetica. Conservare a 2-8°C. Se le analisi vengono ritardate per più di 5 giorni, conservare i campioni ad una temperatura pari o inferiore a -20°C. I campioni acuti vanno prelevati all'insorgere dell'affezione e quelli convalescenziati dopo due e quattro settimane, in modo da controllare le modifiche di titolazione.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEI REAGENTI

1. **Preparare il tampone di lavaggio** aggiungendo il contenuto (2 ml) del flacone di Tween 20 in 1 litro di tampone PBS. Miscelare bene il tutto.
2. **Preparare diluizioni 1:100** di tutti i campioni di siero dei pazienti e dei quattro (4) sieri di controllo/calibrazione, usando il diluente di lavoro per campioni.

PROCEDURA

Questo kit comprende reagenti e materiali sufficienti per 96 determinazioni.

Materiali richiesti ma non forniti

1. Acqua purificata (distillata o deionizzata)
2. Flaconi di lavaggio o dispositivo automatico di lavaggio EIA
3. Provette o diluente automatico per diluizioni 1:100
4. Pipette di precisione per microlitri
5. Coperchio o umidificatore per l'incubazione
6. Lettore EIA dotato di filtro da 450 nm.

Precauzioni

1. Non usare componenti scaduti.
2. Il substrato TMB ed il coniugato sono fotosensibili e sono confezionati in flaconi color paglierino per proteggerli dalla luce. Vanno conservati al buio e riposti in magazzino dopo l'uso.
3. I reagenti liquidi contengono lo 0,01% di thimerosal, una sostanza la cui ingestione è tossica.
4. La soluzione di arresto contiene 0,2 N di acido solforico. Se tale acido viene in contatto con la pelle, lavarsi attentamente con acqua e richiedere l'intervento di un medico.

PROCEDURA DI SAGGIO

1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima di dare inizio al procedimento.
2. Pipettare **100 µl di ciascun siero diluito**, controllo negli appropriati micropozzetti. Si consiglia l'uso di molteplici micropozzetti per il controllo di esclusione.
3. Coprire i pozzetti per ridurre al minimo l'evaporazione e poi **incubarli per 60 minuti** a temperatura ambiente (20-25°C). Durante l'incubazione o prima di essa, preparare il tampone di lavaggio aggiungendo il contenuto di un flacone di Tween 20 in un litro di soluzione PBS.
4. **Lavare le piastre quattro (4) volte** sotto un getto delicato di Tampone di Lavaggio da un flacone di lavaggio o con un lavapiastre EIA multipozzetto, rimuovendo i residui di tampone dai micropozzetti.
5. Aggiungere in ciascun micropozzetto **100 µl di Coniugato Enzimatico**. Coprire ed incubare al buio per 30 minuti a temperatura ambiente.
6. **Lavare** i micropozzetti come indicato nel passo 4 di cui sopra.
7. Aggiungere in ciascun micropozzetto, con una sequenza tempificata, **100 µl di Substrato TMB** e far reagire al buio per esattamente 10 minuti.
8. Arrestare la reazione, con la stessa sequenza tempificata, aggiungendo **100 µl di Soluzione di Arresto**.
9. Leggere l'adsorbanza con un lettore per micropiastre dotato di un filtro da 450 nm.

CONTROLLO QUALITA'

Il controllo di esclusione viene fornito per discriminare i sieri reattivi da quelli non reattivi. Tale controllo è impostato su un indice di 1,0. Dividendo i valori di adsorbanza dei sieri testati per il valore medio di adsorbanza dei micropozzetti di controllo di esclusione, si deriva il valore d'indice di ciascun siero. Indici compresi tra 0,9 ed 1,1 possono essere considerati dubbi. Indici superiori ad 1,1 sono considerati positivi e quelli inferiori a 0,9 vanno considerati negativi.

I valori di adsorbanza dei controlli devono inoltre essere paragonati ai seguenti valori:

Controllo positivo >1,0 A₄₅₀
 Calibratore di esclusione = 0,3-0,4 A₄₅₀
 Controllo negativo <0,2 A₄₅₀

Se uno qualsiasi dei valori di controllo eccede queste gamme, la serie di test va considerata nulla, è necessario ricontrollare i componenti dei reagenti ed i passi procedurali e bisogna ripetere il saggio dall'inizio.

LIMITAZIONI

Questa procedura rileva anticorpi specifici di gruppo ed è pertanto incapace di differenziare tra i membri del gruppo del tifo. In genere, non viene rilevata reattività al gruppo della febbre maculosa o al tifo delle boscaiglie.

VALORI PREVISTI

La prevalenza di anticorpi specifici varia a seconda della regione geografica e della popolazione analizzata. Le aree endemiche risultano avere tassi sieropositivi del 7-26%, anche se alcuni casi sono certamente lievi o subclinici.

BIBLIOGRAFIA

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

Versione B (12/4/2003)