

Návod k použití

ELISA souprava pro detekci IgM protilátek proti Rickettsiám skupiny tyfu

Katalogové číslo: RTM-96K

Velikost: 96 testů

Uchovávání: 2-8°C

Nepřímá enzymová imunoanalýza pro detekci IgG třídy protilátek proti *R. typhi* a *R. prowazekii* v lidském séru nebo plazmě.

Pouze pro diagnostické účely *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

Zamýšlené použití

Tento test je určen pro kvalitativní detekci IgM lidských protilátek proti *R. typhi* a *R. prowazekii* jako pomoc při diagnostice lidské infekce způsobené tímto patogenem.

Shrnutí a vysvětlení testu

R. typhi a *R. prowazekii* se nachází po celém světě. Infekce se přenáší infikovanými blechami resp. výkaly vši. Následná infekce indukuje specifickou protilátkovou odpověď, která může být detekována a použita jako nepřímý průkaz infekce člověka.

Jamky jsou potaženy vnějším membránovým proteinem připraveným z *R. typhi*. Séra pacientů jsou nejprve naředěna 1:10 v IgM Serum Prep, který vyváže IgG a revmatoidní faktor, potom jsou ředěna 10x v ředícím roztoku pro vzorky a inkubovány. Během inkubace se sérové protilátky naváží na antigen na pevné fázi. Jamky jsou poté promyty kvůli odstranění nezreagovaných sérových proteinů a přidá se peroxidázou značený anti lidský IgM konjugát. Po inkubaci se nenavázaný konjugát odstraní promytím. Pro kvantifikaci se přidá TMB substrát. Vytvoří se modré zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství reaktivních sérových protilátek. Tato reakce se přeruší přidáním Stop roztoku, jehož účinkem se zbarvení změní na žluté. Intenzita zbarvení se měří při vlnové délce 450 nm na readeru nebo spektrofotometru.

REAGENCIE

MW Ag

96 jamková mikrodestička

12x8 jamkové proužky potažené vnějším membránovým proteinem (rOmpB), extrahovaným z *R. typhi*, balené s desikantem, ready to use.

IgM Dil

IgM Serum Prep, 10 ml

Pufr obsahující kozí anti lidské IgG protilátky, ready to use

SAMP DIL

Ředící roztok pro vzorky, 2x 50 ml

Fosfátový pufr obsahující boviní sérový albumin a Tween 20.

CONJ ENZ

Konjugát, 12 mL

Afinitně purifikované HRP značené kozí antilidské IgM (těžký řetězec) ready to use. Chraňte před světlem.

CONT +

Pozitivní kontrola, 120 µL

Reaktivní lidské sérum, 10x předředěno

CAL ±

Kalibrátor, 200 µl

Cut-off reaktivní lidské sérum, 10x předředěno.

CONT -

Negativní kontrola, 120 µl

Nereaktivní lidské sérum, 10x předředěno.

SOLN TMB

TMB substrát, 12 ml

Roztok obsahující H₂O₂ a tetrametylbenzidin (TMB). Ready to use. Chraňte před světlem.

SOLN STOP

Stop roztok, 12 ml

Naředěná kyselina sírová, ready to use. Může být uchovávána za pokojové teploty.

BUF WASH PBS

PBS, 1 litr

Prášek dejte do 1 litru purifikované vody pro vytvoření PBS o pH 7.2. Pečlivě promíchejte.

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

Roztok 25% Tweenu 20 a 75% PBS. Přidejte 2 ml do 1 litru PBS a připravte promývací pufr. Tento pufr lze uchovávat při pokojové teplotě.

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 reagensy zacházejte v souladu se správnou laboratorní praxí.

2. Potažené jamky jsou připravovány s chemicky inaktivovaným antigenem. Přesto je považujte 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). Nepoužitě proužky vraťte do sáčku s desikantem a dobře uzavřete.

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.

PŘÍPRAVA VZORKŮ A REAGENCIÍ

1. Připravte promývací pufr přidáním 2 ml Tweenu 20 do 1 litru PBS a dobře promíchejte.
2. Připravte první ředění 1:10 pro všechna pacientská séra v IgM Serum Prep (neředte kontroly a cut-off kalibrátor). Dobře promíchejte a nechejte stát alespoň 5 minut pro vysrážení agregátů. Tento krok udělejte v jiné mikrotitrační destičce nebo ve zkumavkách.
3. Připravte další ředění směsí z kroku 2. Naředte tyto směsi 1:10 v Sample Diluentu pro získání konečného ředění 1:100.
4. Připravte ředění 1:10 všech kontrol s použitím Sample diluentu.

POSTUP

Souprava obsahuje dostatek reagensů pro 96 jamek.

Požadovaný ale nedodávaný materiál

- destilovaná nebo deionizovaná voda
- promývací zařízení
- testovací zkumavky na manuální sérové ředění nebo automatický dilutor na 1:100 ředění
- přesná pipeta
- krycí víčko pro překrytí destičky
- EIA reader s filtrem na 450 nm

Upozornění

- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
- TMB substrát a konjugát jsou fotosenzitivní a je balen v ochranném obalu. Uchovávejte ve tmě.
- Tekuté reagensy obsahují 0,01% thimerosal, který může být při požití toxický.
- Stop roztok obsahuje 0,2N kyselinu sírovou. Pokud se kyselina dostane do očí, promyjte je vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

PRACOVNÍ POSTUP

Nechejte všechny reagensy a séra před testováním vytemperovat na pokojovou teplotu.

1. Napipetujte 100 µl naředěného séra a kontrol do příslušné jamky. U cut-off kalibrátoru doporučujeme testovat dvě jamky.
2. Přikryjte jamky pro zamezení vypařování a potom inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (20-25 °C).
3. Promyjte destičku 4x jemným proudem promývacího pufru pomocí promývacího zařízení (manuální nebo automatické) a odstraňte zbytky pufru z jamek.
4. Do každé jamky přidejte 100 µl enzymového konjugátu. Přikryjte a inkubujte 30 minut při pokojové teplotě potmě.
5. Promyjte jamky dle návodu v bodě 4.
6. Do každé jamky přidejte 50 µl TMB substrátu a nechejte reagovat přesně 10 minut potmě.
7. Zastavte reakci přidáním 100 µl Stop roztoku (tak aby byl dodržen čas inkubace u všech jamek).
8. Odečtěte absorbance na readru s 450 nm filtrem.

KONTROLA KVALITY

Kalibrátor je určen pro rozlišení mezi reaktivním a nereaktivním sérem. Hodnota indexu pro kalibrátor je 1. Podělením OD hodnoty testovaného séra OD hodnotou kalibrátoru se určí index pro každé testované sérum. Hodnoty mezi 0,9 a 1,1 určují šedou zónu (předpokládaný koeficient variance 20%). Hodnoty nad 1,1 znamenají pozitivní výsledek, hodnoty pod 0,9 znamenají výsledek negativní.

LIMITACE

Tento test detekuje protilátky proti proteinovému antigenu a vykazuje negativní výsledky pokud je pacientova protilátková odpověď pouze proti LPS antigenu. Na základě dat získaných z testování western blotem jsou séra reagující pouze na LPS většinou falešně pozitivní.

Je doporučeno IgG negativní séra, u kterých byl pozitivní IgM test dále označit jako IgM negativní a to na základě publikovaných studií (2). Tato pozitivita se dále zkoumá.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Rozšíření specifických protilátek se mění v závislosti na geografickém území a testované populaci. Pozitivita je očekávána pouze u IgG pozitivních akutních případů.

LITERATURA

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

Version A (7/30/2003)