

GEBRAUCHSANLEITUNG

EIA-IgM-Antikörper-Kit für *Rickettsia typhi*

Katalognummer: RTM-96K

Format: 96 Tests
(12 x 8 Mikrotitervertiefungen)

Aufbewahrung: 2 – 8 °C

Ein indirekter Enzym-Immunoassay für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Antikörpern der IgM-Klasse gegen *Rickettsia typhi* in Humanserum bzw. -plasma.

In-vitro-Diagnostikum



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 USA
Tel.: +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
38033 Grenoble Cedex 2 – Frankreich

VERWENDUNGSZWECK

Der IgM-Antikörper-Kit für *Rickettsia typhi* ist für den Nachweis und die Quantifizierung von menschlichen Antikörpern der IgM-Klasse gegen *Rickettsia typhi* vorgesehen und soll die Diagnose menschlicher Infektionen durch diesen 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.

Die EIA-Mikrotitervertiefungen dieses Kits sind mit nativen Antigenen der äußeren Membran von *Rickettsia typhi* beschichtet. Die Patientenserum (und parallel zu diesen auch Kontrollen) werden zunächst im Verhältnis 1:10 in einem Serumvorbehandlungsreagenz verdünnt, um Rheumafaktor-Komplexe und überschüssiges IgG aus der EIA-Reaktion zu eliminieren. Nach dieser Behandlung werden die Seren im Verhältnis 1:10 weiterhin in Probenverdünnungsmittel verdünnt, so dass sich eine letztendliche Serumverdünnung von 1:100 ergibt. Die so behandelten Proben werden in den beschichteten Mikrotitervertiefungen inkubiert, damit eine Reaktion mit den Festphasen-Antigenen erfolgen kann. Anschließend werden die Mikrotitervertiefungen gewaschen, um nicht gebundene Serumproteine zu entfernen, und enzym-markierte Anti-Human-IgM-Antikörper (Konjugat-Arbeitslösung) werden zugegeben, um die gebundenen Antikörper zu markieren. Nach einer weiteren Inkubation werden die Mikrotitervertiefungen nochmals gewaschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen. Zur Quantifizierung des gebundenen Meerrettichperoxidase-Enzyms (Horseradish Peroxidase, HRP) wird ein Peroxidsubstrat mit Tetramethylbenzidin (TMB) als Chromogen (TMB-Substrat) verwendet, wobei die Tiefe der blauen Farbentwicklung proportional zur Menge an spezifischem Antikörper ist. Diese Reaktion wird mit einer Stopplösung unterbrochen und stabilisiert, wobei die blaue Färbung positiver Reaktionen in eine gelbe umschlägt. Die Farbintensität (Extinktion) wird bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und dazu benutzt, die Serumreaktivität im Vergleich zu Referenzseren quantitativ zu bestimmen.

INHALT DES TESTBESTECKS

MW Ag **EIA-Mikrotitervertiefungen (96)**
12 Streifen à 8 Vertiefungen, mit *Rickettsia typhi*-Antigenen beschichtet und zusammen mit Trockenmittel verpackt, gebrauchsfertig.

IgM DIL **IgM Serum-Verdünnungsmittel, 10 ml**
PBS mit Ziegen-Anti-Human-IgG (Fc γ)-spezifisch).

SAMP DIL **Probenverdünnungsmittel, 2 X 50 ml**
PBS mit Rinderserumalbumin und Tween 20.

CONJ ENZ **HRP-Konjugat, 12 ml**
Braune Flasche mit affinitätsgereinigtem, mit HRP markiertem Ziegen-Anti-Human-IgM (Fc γ)-spezifisch), in Arbeitskonzentration im Lieferumfang enthalten.

CONT + **Positive Kontrolle, 120 μ l**
Fläschchen mit blauem Verschluss; enthält unverdünntes Humanserum, stark reaktiv auf *Rickettsia typhi*.

CAL ±**Cutoff-Kalibrator, 200 µl**

Fläschchen mit grünem Verschluss; enthält unverdünntes Humanserum, schwach reaktiv auf *Rickettsia typhi*.

CONT -**Negative Kontrolle, 120 µl**

Fläschchen mit rotem Verschluss; enthält unverdünntes Humanserum, nicht reaktiv auf *Rickettsia typhi*.

SUBS TMB**TMB-Substrat, 6 ml**

Eine H₂O₂ als Substrat sowie 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) enthaltende Lösung in einer braunen Flasche. Gebrauchsfertig. Vor Licht schützen. Nicht karzinogen.

SOLN STOP**Stopplösung, 12 ml**

Enthält 1 % Schwefelsäure (Vorsicht!); gebrauchsfertig.

BUF WASH PBS**PBS-Lösung, 1 Liter**

Zur Herstellung von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Lösung) mit einem pH-Wert von 7,2 das bereitgestellte Pulver in 1 Liter reinem Wasser auflösen. Zur Herstellung des Waschpuffers: **Reagenzienvorbereitung**

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

Zur Herstellung des Waschpuffers: **Reagenzien-vorbereitung**

Warnhinweise

1. 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.
2. Zur Herstellung der beschichteten Mikrotiter-vertiefungen werden inaktivierte Antigene herangezogen. Dennoch sollten sie als potenziell infektiös angesehen und entsprechend gehandhabt werden.

Aufbewahrung und Handhabung

Die Kit-Komponenten bei 2 – 8 °C aufbewahren. Flaschen und Plattenbeutel vor dem Öffnen auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) bringen. Nicht gebrauchte Teststreifen zusammen mit dem Trockenmittel in den wieder gut verschlossenen Beuteln aufbewahren. Die Beschichtung ist unter diesen Lagerbedingungen für 3 Monate stabil.

PROBENENTNAHME

Blutproben koagulieren lassen und die 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 einfrieren. Akut-Proben sind bei Krankheitsbeginn zu entnehmen, Rekonvaleszenz-Proben zur Feststellung von Titeränderungen in Intervallen von zwei bis vier Wochen.

REAGENZIENVORBEREITUNG

Zur Herstellung des Waschpuffers den Inhalt (2 ml) der Tween 20-Flasche in 1 Liter PBS-Lösung geben und gut mischen.

VERFAHREN

Dieser Kit enthält genügend Reagenzien und Materialien für 96 Bestimmungen.

Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

1. Reines (destilliertes oder deionisiertes) Wasser
2. Waschflaschen bzw. EIA-Waschautomat
3. Teströhrchen oder Verdünnungsautomat für 1:10-Verdünnungen
4. Präzisionspipette(n) für den Mikroliterbereich
5. Deckel oder Feuchtkammer für die Inkubationsschritte
6. EIA-Lesegerät mit 450-nm-Filter.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Keine Komponenten nach deren Verfallsdatum verwenden.
2. TMB-Substrat und Konjugat sind lichtempfindlich und werden lichtgeschützt in braunen Flaschen geliefert. Im Dunkeln aufbewahren und nach Gebrauch sofort wieder an den Aufbewahrungsort zurückbringen.
3. Die flüssigen Reagenzien enthalten 0,001 % Thimerosal, das bei Verschlucken evtl. toxisch ist.
4. Die Stopplösung enthält 0,2 N Schwefelsäure. Sollte diese Säure mit der Haut in Berührung kommen, sofort mit viel Wasser abwaschen und einen Arzt konsultieren.

ASSAY-VERFAHREN**Vor Beginn des zeitlich bestimmten Assay-Verfahrens alle Reagenzien und Seren Raumtemperatur erreichen lassen.**

1. Für alle Patientenseren und alle drei (3) im Lieferumfang enthaltenen Kontroll-/Kalibratorseren 1:10-Verdünnungen in IgM Serum-Verdünnungsmittel herstellen. Gut mischen, und mindestens 5 Minuten lang die Bildung von Präzipitinaggregaten abwarten.
2. Die in Schritt 1 hergestellten Mischungen im Verhältnis 1:10 in Probenverdünnungsmittel verdünnen. Damit ist die endgültige Serumkonzentration 1:100.
3. Von jeder zu testenden Serumverdünnung 100 µL in mindestens eine Mikrotitervertiefung geben. Die Mikrotitervertiefungen abdecken, um die Verdunstung so gering wie möglich zu halten, und anschließend 60 Minuten lang bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) inkubieren.
4. Die Platten 4-mal mit einem schwachen Strahl Waschpuffer aus einer Waschflasche bzw. mit einem Mikrotiterplatten-EIA-Waschautomaten waschen. Den restlichen Waschpuffer durch leichtes Aufschlagen auf einen Stapel saugfähiger Papiertücher beseitigen.
5. In jede Mikrotitervertiefung 100 µl HRP-Konjugat-Arbeitslösung geben. Die Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
6. Die Mikrotitervertiefungen waschen, wie in Schritt 4 oben beschrieben.
7. In jede Mikrotitervertiefung in regelmäßigen Abständen (nach der Uhr) 100 µl TMB-Substrat geben und 10 Minuten im Dunkeln reagieren lassen.

8. Die Reaktion in denselben regelmäßigen Abständen wie oben durch Zugabe von 100 µl Stopplösung stoppen.
9. Die Extinktionswerte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450-nm-Filter bestimmen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Im Lieferumfang enthalten ist eine Cutoff-Kalibrator zur Differenzierung zwischen reaktiven und nicht reaktiven Seren. Es ist auch möglich, die Optikdichte-Werte der Testseren durch die Optikdichte-Werte der Cutoff-Kalibrator zu dividieren und so eine Indexpzahl zu ermitteln, wo die Cutoff-Kalibrator auf eine Indexpzahl von 1,0 eingestellt ist. Indexpzahlen im Bereich von 0,9 bis 1,1 sind nicht eindeutig. Indexpzahlen über 1,1 werden als positiv gewertet und solche unter 0,9 als negativ.

Die Extinktionswerte (E) der Kontrollen müssen außerdem die folgenden Bedingungen erfüllen: Das Messergebnis für die positive Kontrolle muss >1,4 Extinktionseinheiten sein, wobei der Cutoff-Kalibrator 40 – 60 % des Wertes der positiven Kontrolle und die negative Kontrolle <0,2 Extinktionseinheiten aufweisen muss. Falls einer der Kontrollwerte außerhalb dieser Bereiche liegt, sollten dieser Assay-Durchgang als ungültig angesehen, die Reagenzienkomponenten und Verfahrensschritte überprüft und der Assay von Anfang an wiederholt werden.

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.

Erstausgabe November 2002
Aktuelle Ausgabe: A (28. 3. 2003)