

Návod k použití

ELISA souprava pro detekci IgG protilátek proti rickettsiím skupiny skvrnitě horečky

Katalogové číslo: SFG-96K
Velikost: 96 testů
(12 x 8-mikrojamek)
Uchovávání: 2-8°C

Nepřímá enzymová imunoanalýza pro detekci IgG třídy protilátek proti rickettsiím ze skupiny skvrnitě horečky v lidském séru nebo plazmě.

Pouze pro diagnostické účely *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

Tento test je určen pro kvalitativní detekci IgG lidských protilátek proti rickettsiím skupiny skvrnitě horečky jako pomoc při diagnostice lidské infekce způsobené tímto patogenem.

Shrnutí a vysvětlení testu

Rickettsie skupiny skvrnitě horečky se nacházejí po celém světě a jsou přenášeny klíšťaty a roztoči (*Rickettsia akari*), jejichž kousnutí přednáší infekci z přirozených hostitelů (psi a hlodavci). Následná infekce indukuje specifickou protilátkovou odpověď, která může být detekována a použita jako nepřímý průkaz infekce člověka.

Jamky jsou potaženy skupinově specifickým lipopolysacharidovým antigenem (rLPS), připraveným z *Rickettsia conorii*, která patří do skupiny skvrnitě horečky. Mezi další druhy, které mají stejný antigen patří *Rickettsia conorii* (Boutonneuse horečka), *Rickettsia siberica* (sibiřský klíšťový tyfus), *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia akari* (Rickettsiální neštovice) a mnoho dalších. Séra pacientů jsou ředěna v ředícím roztoku pro vzorky a inkubována. 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 IgG 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 LPS antigenem, extrahovaným z *R. conorii*, balené s desikantem, ready to use.

SAMP DIL

Ředící roztok pro vzorky, 2 X 50 mL

PBS obsahující bovinní sérový albumin a Tween.

CONJ ENZ

Enzymový konjugát, 12 mL

Afinitně purifikované HRP značené kozí antilidské IgG (gamma specifický řetězec) ready to use. Chraňte před světlem.

CONT +

Pozitivní kontrola, 120 µL

Lahvička s modrým víčkem obsahující lidské reaktivní sérum, baleno v ředění 1:10.

CAL ±

Cutoff Kalibrátor, 200 µL

Lahvička se zeleným víčkem obsahující lidské sérum hraničně reagující s rickettsiemi skupiny skvrnitě horečky, baleno v ředění 1:10.

CONT -

Negativní kontrola, 120 µL

Lahvička s červeným víčkem obsahuje lidské sérum nereaktivní na rickettsie skupiny skvrnitě horečky, baleno v ředění 1:10.

SUBS TMB

TMB Substrát, 12 mL

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

SOLN|STOP**Stop Roztok, 12 mL**

Naředěná kyselina sírová. Nesmí přijít do kontaktu s kůží.

BUF|WASH|PBS**PBS, 1 litr**

Dejte obsah sáčku do 1 litru purifikované vody, čímž vytvoříte PBS pufr o pH 7.2. Dobře promíchejte. Bližší informace o přípravě viz kapitola Příprava vzorků a reagensii.

BUF|WASH|TWEEN**Tween 20, 2 mL**

Roztok 25% Tweenu 20 a 75% PBS. Bližší informace o přípravě viz kapitola Příprava vzorků a reagensii.

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 reagensii 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). Nepoužité proužky vraťte do sáčku s desikantem a dobře uzavřete. Spotřebujte je do 3 měsíců od otevření.

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 ředění 1:100 všech vzorků sér od pacientů s použitím Sample diluentu.
3. Připravte ředění 1:10 pozitivní, negativní a cut-off kontroly s použitím Sample Diluentu.

POSTUP

Souprava obsahuje dostatek reagensii 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 reagensie obsahují 0,01% thimerosal, který může být při spolknutí toxický.
- Stop roztok obsahuje 0,2N kyselinu sírovou. Pokud tato kyselina přijde do kontaktu s kůží, dobře ji opláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

PRACOVNÍ POSTUP

Nechte všechny reagensie 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 3.
6. Do každé jamky přidejte 100 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. Nejlepší použití této kontroly je v definování intra-assay variance v šedé zóně. Pokud dva nebo více jamek určuje hodnoty cut-off, šedá zóna absorbančních hodnot bude ležet mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou absorbance této kontroly. Nebo lze podělit OD hodnotu testovaného séra OD hodnotou kalibrátoru. Tím získáte hodnotu indexu – pro kalibrátor je 1,0. Hodnoty mezi 0,9 a 1,1 určují šedou zónu. Hodnoty nad 1,1 znamenají pozitivní výsledek, hodnoty pod 0,9 znamenají výsledek negativní.

LIMITACE

Tato reakce detekuje skupinově specifické protilátky a proto není možné odlišit jednotlivé druhy Rickettsií v této skupině. Reaktivita ke skupině tyfové horečky nebo k *Rickettsia tsutsugamushi* nebyla detekována.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Rozšíření specifických protilátek se mění v závislosti na geografickém území a testované populaci. V endemických oblastech byl shledána seropozitivita mezi 7-26%, některé případy byly ale velmi slabě pozitivní nebo bezpříznakové.

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 B (7/15/2008)