

Návod k použití

Souprava pro imunofluorescenční detekci IgG protilátek proti Q horecce

Katalogové číslo: QG-120

Velikost: 120 testů

Uchovávání: 2-8°C

Neprímá imunofluorescenční imunoanalýza pro detekci IgG třídy protilátek proti *Coxiella burnetii*, fáze I a fáze II, v lidském séru nebo plazme

Pouze pro diagnostické účely in vitro



FULLER LABORATORIES

1135 E. Truslow Ave. Fullerton, California 92831 USA

Phone: +1-714-525-7660 Fax +1-714-525-7614

Email: info@fullerlabs.com

Internet: 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 detekci a semikvantifikaci IgG lidských protilátek proti C. burnetii fáze I a fáze II jako pomoc při diagnostice lidské infekce způsobené tímto patogenem.

Shrnutí a vysvětlení testu

Coxiella burnetii je obligátní intracelulární bakteriální parazit eukaryotických buněk. Lidé jsou nejčastěji nakaženi kapénkami od infikovaných zvířat, nebo méně často kousnutím nakaženým klíštětem. Inhalovaná agens se začnou z plic šířit. Způsobují Q horečku, onemocnění podobné chřipce. Chronická choroba se vyvine u přibližně 5 % případů, primárně jako chronická granulomatózní hepatitida, nebo méně často jako endokarditida.

Díky nedostatku charakteristických symptomů u akutního onemocnění a rizikům spojeným s laboratorní izolací se pro diagnostiku používají serologické metody. Pro rozlišení akutní odpovědi rekonvalescentu a chronické protilátkové odpovědi využívá IFA test jedinečných fázových rozdílů nalezených u C. burnetii. Redená séra pacientu simultánně reagují s agens v fázi I i v fázi II v každé jamce sklička. Po promytí a odstranění nezreagovaných sérových proteinů je přidán IgG specifický značený konjugát. Výsledná reakce je vizualizována použitím standardního fluorescenčního mikroskopu, kde pozitivní reakce vypadá jako ostře ohraničená zelená fluorescenční elementární tělíska v červeném kontrastním poli sonikátu žlutkového vaku. Takto pozitivní reakce se může dále testovat ve vyšších redeních k určení konečného titru.

REAGENCIE

IFA Ag x 12

Substrátová skla (10 kusů)

10 x 12-jamková skla obsahující C. burnetii fáze I na levé straně jamky a fáze II na pravé straně jamky, pokud jsou skla situována mléčným koncem vlevo. Formalinem inhibovaný substrát je fixován acetonem a balený ve vakuu.

CONJ FITC

Konjugát, 2.5 mL

Kapací lahvička se žlutým víčkem obsahující afinitně purifikovaný FITC značený kozí antilidské IgG (těžký řetězec) s bovinním sérovým albuminem a Evansovou modří jako kontrastním barvivem.

CONT +

Pozitivní kontrola, 0.5 mL

Kapací lahvička s modrým víčkem obsahující reaktivní lidské sérum v screeningovém redení 1:16 s konečným titrem 1:128 (fáze I) a 1:512 (fáze II).

CONT -

Negativní kontrola, 0.5 mL

Kapací lahvička s červeným víčkem obsahující nereaktivní lidské sérum v screeningovém redení 1:16.

SAMP DIL

IgG Redicí roztok pro vzorky, 20 mL

Pufr obsahující kozí sérum v PBS.

MM**Montovací médium, 1 mL**

Kapací lahvička s bílým víčkem obsahující 50% glycerol v PBS.

BUF WASH PBS**PBS, 1 litr**

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

Upozornění

1. Kontrolní séra byla vyšetřena na přítomnost infekčních agens pomocí FDA doporučené testovací metody. Žádný ztestu ale nezaručí nepřítomnost infekčních agens, proto se všemi reagensy zacházejte v souladu se správnou laboratorní praxí.

2. Substrátová skla jsou připravována s chemicky inaktivovaným antigenem. Presto považujte skla 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).

SBER VZORKU

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 odbery opakujte po 2-4 týdnech kvůli kontrole změny titru.

POSTUP

Souprava obsahuje dostatek reagentů pro 120 jamek.

Požadovaný ale nedodávaný materiál

- destilovaná nebo deionizovaná voda
- čisté 250 nebo 500 ml láhev na PBS
- promývací lázeň s držákem sklíček
- testovací zkumavky nebo mikrotitrací destička na sérové ředění
- přesná pipeta
- 24x50 mm krycí sklíčka
- fluorescenční mikroskop s filtrem pro FITC
- 37 °C vodní lázeň nebo inkubátor
- vlhká komurka

Upozornění

- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
- Konjugát je fotosenzitivní a je balen v ochranném obalu. Uchovávejte ve tme.
- Konjugát obsahuje Evansovu modr, Vyvarujte se styku s kůží.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Připravte si screeningové ředění 1:16 v IgG Sample Diluentu pro všechna zatím netestovaná séra. Pro pozitivní séra z předchozích analýz, připravte sérové dvojkové ředění v PBS.
2. Připravte ředění pozitivní kontroly v PBS, tak aby zahrnovalo jedno ředění nad konečným titrem a jedno ředění pod konečným titrem.
3. Pro každé narezené sérum přidejte 15 µl na každou jamku sklíčka a označte pro pozdější vyhodnocení. Pro každou analýzu testujte negativní i pozitivní kontrolu připravenou podle bodu 2.
4. Umístete sklíčka do vlhké komurky a inkubujte 30 minut při 37[±] 0.5°C .
5. Vyjmete vlhkou komurku z inkubátoru nebo vodní lázně. Promyjte jamky 3x pomocí slabého proudu PBS. Vytřepte pufr ze sklíček.
6. Do každé jamky sklíčka přidejte 15 µl (1 kapku) konjugátu a vraťte zpět do vlhké komurky a inkubujte 30 minut při 37[±] 0.5°C ve tme.
7. Promyjte skla dle bodu 5, potom přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé sklíčko a přikryjte krycím sklem.
8. Odectete nabarvená sklíčka při 400x zvětšení vzhledem k intenzitě záření negativní a pozitivní kontroly. Pamatujte, že v mikroskopu je antigen fáze 2 na levé straně a antigen fáze 1 na straně pravé vašeho zorného pole. Sklíčka se uchovávají při 2-8°C ve tme po dobu 24 hodin.

KONTROLA KVALITY

Negativní kontrolní sérum a narezené pozitivní kontrolní sérum by se mělo vyšetřovat každý den. Negativní kontrola je příklad nereaktivního séra, které se vyznačuje jednotným červeným zbarvením kontrastním barvivem. Jamka pozitivní kontroly by měla mít konečný titr v dvojkovém ředění tak, jak je určeno pro toto sérum. Pokud žádná z kontrol nereaguje tak jak je popsáno, analýza by měla být zrušena, reagentie a pracovní postup by se měly znovu prekontrolovat a celý postup se musí zopakovat.

Negativní kontrola je příkladem fluorescence, která se odectě jako negativní výsledek. Jestliže pozorujete záření i v tomto poli, shodné se zářením pozitivní kontroly, došlo k chybě v pracovním postupu a celou analýzu je třeba zopakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKU

Pozitivní reakce vypadá jako jasné zářící (nejméně na 1 křížek) elementární telíska na červeném pozadí. Velikost částic, vzhled a hustota pole je třeba porovnat s negativní a pozitivní kontrolou. Jiný typ reaktivity odlišný od pozitivní kontroly je třeba odečíst jako nespecifický.

VZORKY PACIENTU

Pozitivní ve screeningovém redení 1:16: IgG titry 1:16 a vyšší proti fázi II ukazují na infekci v neurčeném case (séropozitivita) Titry proti fázi I by měly být ve většině případů stejné nebo vyšší oproti titrum fáze II. Pozitivní séra by se měla znovu testovat až do zjištění konečného titru kvůli srovnání s dříve nebo později odebranými vzorky od stejného pacienta.

Negativní v titru 1:16: Zaznamenejte jako negativní na protilátky proti *C. burnetii*. Další vzorek je vhodné vyšetřit v případech, kdy sérum bylo odebráno ihned po nástupu symptomu, hlavně pokud byla zahájena antibiotická léčba.

Párová séra: Ctyrnásobný vzestup titru mezi akutním a rekonvalescentním sérem naznačuje nedávnou infekci způsobenou *Anaplasma phagocytophila* nebo příbuzného mikroorganismu.

LIMITACE

Organismy fáze II mají v buněčné membráně IgG Fc receptory. IgG Sample Diluent je určen pro vysycení receptoru nevýznamnými (kožními) IgG, tak aby umožnil specifickou IgG reakci s lidským sérovým vzorkem. Zvýšené hladiny sérových IgG mohou vést k nízkým nespecifickým titrum dokonce i v přítomnosti speciálního diluentu, ačkoli byly specificky spojeny s organismem fáze II a nebyly doprovázeny IgM nebo IgA titry.

OCEKÁVANÉ HODNOTY

Rozšíření specifických protilátek závisí na zeměpisné oblasti a testované populaci. IgG titry fáze II jsou obecně detekovatelné během prvního týdne po nástupu a vrcholu dosáhnou kolem osmého týdne. Většina akutních případů má stále pozitivní titr IgG protilátek fáze II i po 1 roce.

IgG titry fáze I narozdíl od fáze II, jsou velmi často pod detekovatelnou hladinou, pokud se nerozvine chronické onemocnění. Chronická hepatitida je charakterizována vysokými a vyrovnanými titry fáze I i fáze II, kdežto u endokarditidy jsou vyšší titry fáze I. IgM a IgA titry proti tomto antigenu také pomáhají v diferenciální diagnostice.

LITERATURA

Peacock MG, Philip RN, Williams JC, Faulkner RS. Serological Evaluation of Q Fever in Humans. *Infect. Immun.* 1983;41: 1089-1098.

Revised 7/99