

Návod k použití

Souprava pro imunofluorescenční detekci IgM protilátek proti *Anaplasma Phagocytophilum/Ehrlichia chaffeensis*

Katalogové číslo: E21M-120
Velikost: 120 testů
Uchovávání: 2 – 8 °C

Tato souprava je určena pro detekci a semikvantifikaci IgM protilátek proti *Anaplasma phagocytophilum* a *Ehrlichia chaffeensis* pomocí nepřímé imunofluorescence.

Pouze pro in-vitro diagnostiku



FULLER LABORATORIES
1135 E. Truslow Ave. Fullerton, California 92831
USA
Phone: +1-714-525-7660 Fax +1-714-525-7614
Email: info@fullerlabs.com
URL: www.fullerlabs.com



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

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Anaplasma phagocytophilum a *Ehrlichia chaffeensis* IFA IgM souprava je určena pro detekci a semikvantifikaci IgM třídy lidských protilátek proti *Anaplasma phagocytophilum* a *Ehrlichia chaffeensis* pomocí mikroimunofluorescenční analýzy.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ TESTU

Ehrlichia chaffeensis i *Anaplasma phagocytophilum* jsou klíšťaty přenášené lidské patogeny. IFA analýza využívá částečně purifikované elementární tělíska a moruly z buněčných kultur. Pro optimální přilnavost a kontrastní pozadí jsou tyto antigeny rozptýleny v matici sonikovaného buněčného materiálu.

Pacientská séra jsou předčištěna kvůli odstranění zdroje revmatoidního faktoru a následně naředěna PBS puřem. Potom jsou inkubována v jednotlivých jamkách sklíčka, aby mohly reagovat pacientské protilátky s antigeny. Sklíčka jsou poté promyta, kvůli odstranění nezreagovaných proteinů v séru, a je přidán značený anti-lidský IgM konjugát. Konjugát se nechá reagovat s komplexem antigen-protilátka. Nezreagovaný konjugát se pak vymyje. Výsledek reakce je zviditelněn použitím standardního fluorescenčního mikroskopu, kde pozitivní reakce vypadá jako ostře ohraničené zeleně fluoreskující inkluze (moruly) a malé koky na pozadí červené buněčné matrix. Při prohlížení sklíček zleva doprava je vidět jako první *Anaplasma phagocytophilum*. Vpravo od tohoto antigenu, v každé jamce sklíčka, je antigen *Ehrlichia chaffeensis*. Pozitivní reakce při screeningovém ředění by měla být znovu otestována při vyšším ředění, aby se určilo nejvyšší nebo koncové ředění.

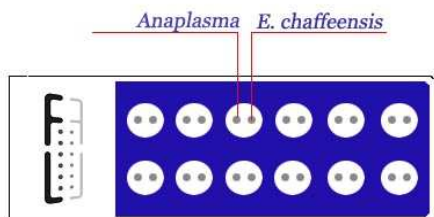
REAGENCIE

IFA Ag x 12

Substrátová

sklíčka (10)

10 x 12 – jamková sklíčka obsahují antigeny *Anaplasma phagocytophilum* (vlevo) a *Ehrlichia chaffeensis* (vpravo), oba antigeny rozptýlené na pozadí buněčné matrix. Sklíčka jsou fixována a balena ve vakuu a připravena k použití.



CONJ FITC

IgM konjugát,

2.5 mL

Kapací lahvička se žlutým vrškem obsahující afinitně purifikované oslí anti-lidské protilátky IgM (těžký řetězec) značené fluoroforem DyLight 488, s bovinním sérovým albuminem a Evansovou modří jako kontrastním barvivem.

SAMP DIL

IgM Roztok na ředění vzorků,

15 mL

PBS obsahující kozí anti-lidské IgG, připraveno k použití.

CONT +

EC Pozitivní kontrola,

0.5 mL

Kapací lahvička s modrým vrškem obsahující *E. chaffeensis* - reaktivní předčištěné sérum ve screeningovém ředění 1:64, s konečným titrem 1:512 (1:256-1:1024).

CONT +

AP Pozitivní kontrola,

0.5 mL

Kapací lahvička s modrým vrškem obsahující *A. phagocytophilum* - reaktivní předčištěné sérum ve screeningovém ředění 1:64, s konečným titrem 1:512 (1:256-1:1024).

CONT -

Negativní kontrola,

0.5 mL

Kapací lahvička s červeným vrškem obsahující nereaktivní sérum ve screeningovém ředění 1:64.

MM

Montovací medium,

1 mL

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

BUF WASH PBS

PBS,

1 liter

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

Upozornění

1. Protože žádné testy nemohou zajistit nepřítomnost infekčních agens, mělo by být s kontrolami, stejně jako se všemi sérovými vzorky a zařízením, které s nimi přijde do styku, zacházeno v souladu se správnou laboratorní praxí, aby se zabránilo kontaktu s kůží a požití.

2. Substrátová skříčka jsou připravována s chemicky inaktivovanými antigeny. Přesto považujte skříčka 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).

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.

POSTUP

Souprava obsahuje dostatek reagensů pro 120 jamek.

Požadovaný, ale nedodávaný materiál

- destilovaná nebo deionizovaná voda
- čisté 250 nebo 500 ml láhev na PBS
- testovací zkumavky nebo mikrotitrační destička na sérové ředění
- přesná pipeta
- 24x50 mm krycí skříčka
- fluorescenční mikroskop s filtrem pro FITC (max. excitační vlnová délka 490 nm, střední vyzařovací vlnová délka 530 nm), 400x zvětšení
- 37 °C vodní lázeň nebo inkubátor
- vlhká komůrka pro inkubovanou skříčka

Bezpečnostní opatření

- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
- Konjugát je fotosenzitivní a je balen v ochranném obalu. Uchovávejte ve tmě.

- Konjugát obsahuje Evansovu modř, která může být karcinogenní. Vyvarujte se styku s kůží.
- kapalné reagentie obsahují thimerosal v množství 0,01%, který může být toxický po pozření.

PŘÍPRAVA VZORKŮ A REAGENCIÍ

- Příprava promývacího pufru** přidáním obsahu balíčku s PBS do 1 litru purifikované vody a důkladným promícháním.
- Příprava screeningového ředění** patientských sér - připravením počátečního ředění 1:16 v centrifugačních zkumavkách, za použití roztoku na ředění vzorků. Promíchejte a nechte minimálně 5 minut reagovat, potom centrifugujte při vysoké rychlosti – kvůli odstranění agregovaných IgG. Rozřeďte 10 µL supernatantu s 30 µL promývacího pufru, výsledné ředění je pak 1:64.

PRACOVNÍ POSTUP

Všechny reagentie a séra nechejte před vlastním testováním vytemperovat na pokojovou teplotu!

- Připravte ředění každé pozitivní kontroly, které bude zahrnovat 1 ředění nad konečným titrem a 1 ředění pod tímto titrem (tj. 1:256-1:1024). Kontroly jsou balené v ředění 1:64.
- Do každé jamky dejte 10 µl každého sérového ředění a zaznamenejte polohu pro příští vyhodnocení. Pro každý test vyšetřete negativní i pozitivní kontrolu.
- Umístěte sklíčka do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37 °C ± 0,5 °C.
- Vyjměte vlhkou komůrku z inkubátoru. Připravte si konjugát. Promyjte sklíčka jemným proudem PBS z promývací láhve. Vyřete zbytek PBS ze sklíček a osušte. Opakujte tento postup 3x, aniž by vám jamky vyschly.
- Do každé jamky přidejte 1 kapku (10 – 15 µL) konjugátu a potom dejte sklíčka zpět do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37 °C ± 0,5 °C. Inkubace by

měla probíhat potmě, abyste ochránili fotosenzitivní konjugát.

- Promyjte sklíčka podle bodu 4.
- Přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé sklíčko a opatrně přikryjte krycím sklem.
- Odečtěte nabarvená substrátová sklíčka při 400 násobném zvětšení, porovnejte každou jamku s intenzitou záření pozitivní a negativní kontroly. Sklíčka mohou být uchovávána při 2-8 °C potmě po dobu 24 hodin.

KONTROLA KVALITY

Negativní kontrola a naředěné pozitivní kontroly by se měly vyšetřovat každý den. Negativní kontrola je příklad nereaktivního séra, které se vyznačuje jednotným červeným kontrastním zbarvením nebo jemným, ale uniformním zeleným zbarvením. Jamka pozitivní kontroly by měla mít konečný titer mezi 1:256 a 1:1024. Intenzita fluorescence při ředění 1:512 by měla být použita jako cut-off hodnota pro vzorky pacientů, kteří jsou pozitivní. Pokud žádná z kontrol nereaguje tak jak je popsáno, analýza by měla být zrušena, reagentie a pracovní postup by se měly znovu přezkontrolovat a celý postup se musí zopakovat.

Negativní kontrola je příkladem fluorescence, která se odečte 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 VÝSLEDKŮ

Pozitivní reakce se jeví jako fluorescenční částice na červeném pozadí matrix. Velikost, vzhled a intenzita reakce musí být vždy porovnána s pozitivní a negativní kontrolou.

Vzorky pacientů

Negativní při ředění 1:64: Označte jako negativní na příslušné protilátky. Další vzorky séra by měly být vyšetřeny, jestliže byly původní odebrány brzy po nástupu symptomů a je stále podezření na ehrlichiozu.

Pozitivní při ředění 1:64 a vyšším: Sérové titry 1:80-1:320 naznačují 1) titry před vrcholem hladiny protilátek (časná expozice), 2) titry po vrcholu hladiny protilátek (po expozici) nebo 3) titry odrážející zkříženou reaktivitu k podobným organismům (např. *Ehrlichia* spp). Titry vyšší než 1:320 a/nebo IgM titry, pokud jsou přítomny, jsou významným indikátorem nedávné infekce.

Párová séra: Čtyřnásobný vzestup titru mezi akutním a rekonvalescentním sérem naznačuje nedávnou infekci způsobenou *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* nebo příbuzného mikroorganismu.

LIMITACE

Zkřížená reakce mezi *Ehrlichia chaffeensis* a *Ehrlichia canis* a *Ehrlichia ewingii* u metody IFA je různá, od slabé až po silnou, a může být rozlišena různými alternativními metodami např. Western blotem.

SPECIFICKÉ VLASTNOSTI

Specifita Anaplasmy byla testována na 95 sérech z neendemické oblasti. Všechny 95 sér měly titry < 1:80. Bylo testováno také 12 sér z národní referenční laboratoře. Všechny 8 pozitivních sér bylo detekováno s titry za 1 ředění a 4 negativní séra byla všechna < 1:80. Séra s *E. chaffeensis* s titrem > 1:80 byla při srovnání se standardem při vyšetření všechna pozitivní.

Séra z neendemického regionu *Ehrlichia chaffeensis* byla testována „in-house“, 159 z New Yorku a 120 z Jižní Kalifornie. Nebyly zde pozitivní záchyty. (100% specifita). Ačkoli byla séra z New Yorku z endemického regionu na *Anaplasma Phagocytophilum*, byl nalezen u 14 séropozitivních psů (8,8%) příbuzný organismus.

REFERENCE

1. Dumler, J. S., K. M. Asanovich, J. S. Bakken, P. Richter, R. Kimsey, and J. E. Madigan. 1995. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*. J. Clin. Microbiol. 33:1098-1103.
2. IJdo, J. W., Y. Zhang, E. Hodzic, L. A. Magnarelli, M. L. Wilson, S. R. Telford III, S. W. Barthold, and E. Fikrig. 1997. The early humoral response in human

granulocytic ehrlichiosis. J. Infect. Dis. 176:687-692.

3. Magnarelli, L. A., J. W. IJdo, J. S. Dumler, R. Heimer, and E. Fikrig. 1998. Reactivity of human sera to different strains of granulocytic ehrlichiosis in immunodiagnostic assays. J. Infect. Dis. 178:1835-1838.
4. Walls, J. L., M. Agüero-Rosenfeld, J. S. Bakken, J. L. Goodman, D. Hossain, R. C. Johnson, and J. S. Dumler. 1999. Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. J. Clin. Microbiol. 37:2968-2973.
5. Ristic, M., D.L. Huxsoll, Weisiger, R.M., Hildebrandt, P.K., and Nyindo, M.B.A. 1972. Serological Diagnosis of tropical Canine Pancytopenia by Indirect Immunofluorescence. Infect. Immun. 6:226-231.
6. McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Boudreaux, C, Guedry, T, and Walker, D.H. 2003. Kinetics of Antibody Response to *Ehrlichia canis* Immunoreactive proteins. Infect. Immun. 71:2516-2524.
7. Ohashi, N., Unver, A., Zhi, N., and Rikihisa, Y. 1998. Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major outer membrane Proteins of *Ehrlichia canis* and Application to the Recombinant Protein for Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 36:2671-2680.
8. Unver, A., Rikihisa, Y., Ohashi, N., Cullman, L., Buller, R., and Storch, G.A. Western and Dot Blotting Analyses of *Ehrlichia chaffeensis* Indirect Fluorescent-Antibody Assay-Positive and -Negative Human Sera by Using native and Recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* Antigens. J. Clin. Microbiol. 37:3888-3895.
9. Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. and Hancock, S.I. 1998. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J. Clin. Microbiol. 36:2645-2651.

Original 7/95

Current Version D (4/05)

LABOSERV s.r.o., Hudcova 532/78b, 612 00 Brno

Kontakty na dodavatele:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78 b, 612 00 Brno

Česká republika

T: + 420 541 243 113

F: + 420 541 243 114

M: + 420 737 245 070

email: objednavky@laboserv.cz ,

laboserv@laboserv.cz,

<http://www.laboserv.cz>