

Návod k použití

Souprava pro imunofluorescenční detekci IgM protilátek proti *Anaplasma phagocytophilum*

Katalogové číslo: EEM-120

Velikost: 120 testů

Uchovávání: 2 – 8 °C

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

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
URL: www.fullerlabs.com



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

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Anaplasma phagocytophilum (Human Granulocytic Ehrlichiosis) IFA IgG souprava je určena pro detekci a semikvantifikaci IgM třídy lidských protilátek proti *Anaplasma phagocytophilum* pomocí nepřímé imunofluorescenční analýzy.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ TESTU

Lidská granulocytární ehrlichioza byla poprvé objevena v roce 1994 podle charakteristických cytoplazmatických inkluzí nalezených v neutrofilech. Serologická odpověď těchto pacientů byla specifická k *Ehrlichia equi*, známému veterinárnímu patogenu. Molekulární analýzou byla prokázána vysoká shoda u *E. equi* a *E. phagocytophila*. IFA analýza využívá k detekci specifických lidských protilátek proti tomuto patogenovi infikované a fixované lidské HL-60 myelocyty.

Pacientská séra jsou naředěna na screeningové ředění v IgM Sample Diluentu, kde se nejprve vyváží IgG protilátky a revmatoidní faktor. Takto ošetřená séra jsou poté přenesena na substrátová skla do příslušných jamek s navázaným antigenem. Skla jsou promyta a je přidán anti-lidský IgM konjugát značený DyLight 488. Konjugát se nechá inkubovat s komplexem antigen-protilátka a poté se nezureagovaný konjugát vymyje. Výsledek reakce je zviditelněn použitím standardního fluorescenčního mikroskopu, kde pozitivní reakce vypadá jako ostře ohraničené zeleně fluoreskující inkluze v cytoplasmě infikovaných buněk. Negativní reakce vypadá buď jako červené buňky zbarvené kontrastním barvivem nebo fluorescence nepodobná pozitivní reakci. Pozitivní reakce se dále testuje ve vyšších ředěních a určení konečného titru.

REAGENCIE

IFA Ag x 12

Substrátová skla (10)

10 x 12-well skla obsahující fixované THP-1 buňky infikované lidským izolátem *Anaplasma phagocytophilum*.

CONJ FITC

IgM Konjugát, 2.5 mL

Kapací lahvička se žlutým víčkem obsahující afinitně purifikovaný DyLight 488 značené oslí antilidské IgM (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 ředění 1:16 s konečným titrem 1:128.

CONT -

Negativní kontrola, 0.5 mL

Kapací lahvička s červeným víčkem obsahující nereaktivní lidské sérum ve screeningovém ředění 1:16

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.

IgM DIL

IgM Sample Diluent, 15 mL

PBS obsahujícího kozí anti-lidský IgG (těžký řetězec).

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. Substrátová skla jsou připravována s chemicky inaktivovaným antigenem. Přesto 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 nechte 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
- promývací lázeň s držákem sklíček
- testovací zkumavky nebo mikrotitrační destička na sérové ředění
- přesná pipeta
- 24x50 mm krycí sklíčka
- 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

Upozornění

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

Příprava reagensů

PBS: Přidejte obsah balení k 1 litru purifikované vody. Vymyjte všechny zbývající krystalky ze sáčku. Míchejte až do úplného rozpuštění.

PRACOVNÍ POSTUP

Všechny reagensy a séra nechte před vlastním testováním vytemperovat na pokojovou teplotu!

1. Připravte screeningové ředění 1:16 (1 díl séra a 15 dílů IgM Sample Diluentu v pracovním ředění) všech sér pacientů. Nechte séra 30 minut reagovat. Potom můžete centrifugovat, centrifugace ale není nutná.

U pozitivních sér z předchozího testování připravte dvojkové ředění v PBS, jako první titr nechte 1:16.

2. Připravte ředění pozitivní kontroly v PBS, které bude zahrnovat 1 ředění nad konečným titrem a 1 ředění pod tímto titrem (tj. 1:64-1:256).

3. Pro každé sérové ředění přidejte 10 µl do každé jamky a zaznamenejte polohu jamky pro pozdější vyhodnocení. Do každého testu přidejte 1 negativní a pozitivní kontrolu.

4. Umístěte sklíčka do vlhké komůrky a inkubujte 90 minut při 37±0.5°C.

5. Vyjměte vlhkou komůrku z inkubátoru. Připravte si konjugát. Promyjte skla jemným proudem PBS z promývací lahve. Vytřepete zbytek PBS ze sklíček a osušte. Opakujte tento postup 3x, aniž by vám jamky vyschly.

6. Do každé jamky přidejte 1 kapku (10-15 µl) konjugátu a potom dejte skla zpět do vlhké komůrky a inkubujte 30 minut při 37±0.5°C. Inkubace by měla probíhat potmě abyste ochránili fotosenzitivní konjugát.

7. Promyjte skla dle bodu 5.

8. Přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé sklo a umístěte na ně krycí sklo. Opatrně odstraňte případné vzduchové bublinky.

9. Odečtěte nabarvená substrátová skla při 400 násobném zvětšení, porovnejte každou jamku s intenzitou záření pozitivní a negativní kontroly. Skla se uchovávají při 2-8°C potmě po dobu 24 hodin.

KONTROLA KVALITY

Negativní kontrolní sérum a naředěné pozitivní kontrolní sérum by se mělo vyšetřovat každý den. Negativní kontrola je příkladem nereaktivního séra, které se vyznačuje jednotným červeným zbarvením kontrastním barvivem nebo jemným ale uniformním zeleným zbarvením. Jamka pozitivní kontroly by měla mít konečný titr mezi 1:64 a 1:256. Intenzita fluorescence při ředění 1:128 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, reagensy a pracovní postup by se měly znovu překontrolovat a celý postup se musí zopakovat.

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

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pozitivní reakce vypadá jako jeden nebo více rozdílných zelených fagozomů (morulae) uvnitř cytoplazmy infikované buňky. Velikost, vzhled a intenzita reakce musí být vždy porovnána s pozitivní a negativní kontrolou.

Vzorky pacientů

Pozitivní při 1:16 screeningovém ředění: IgM titry 1:16 a vyšší jsou považovány za průkaz nedávné infekce způsobené *Ehrlichia* spp. Séra pozitivní ve screeningovém ředění 1:16 by se měla dále testovat až do určení konečného titru kvůli pozdějšímu srovnání se vzorky od stejného pacienta odebranými dříve nebo později

Negativní při ředění 1:16: Označte jako negativní na *Ehrlichia equi* protilátky. Další vzorek je vhodné vyšetřit v případě, kdy sérum bylo odebráno ihned po nástupu symptomů a stále existuje podezření na HGE.

LIMITACE

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

CHARAKTERISTIKA PROVEDENÍ

Specifičnost testu byla testována na 95 sérech z neendemického regionu. Všechny 95 měly titry menší než 1:16. Kvůli porovnání bylo testováno 12 sér z místní referenční laboratoře. Všechny 6 pozitivních sér byly detekovány s titry +/- jedno ředění a 6 negativních sér měla titr menší než 1:16.

LITERATURA

1. Bakken, J. S., J. S. Dumler, S. M. Chen, M. R. Eckman, L. L. Van Etta, and D. H. Walker. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA* 272:212-218
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Walls, J. L., M. Aguero-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.

Version New (2/00)

Revision A 12/2009