

Návod k použití

Souprava pro imunofluorescenční detekci IgM protilátek proti Q horecce

Katalogové číslo: QM-120

Velikost: 120 testů

Uchovávání: 2-8°C

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

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 IgM 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 kličetem. Inhalovaná agens se začíná 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 pacientů simultánně reagují s agens ve fázi I i ve fázi II v každé jamce sklička. Po promytí a odstranění nezureagovaných sérových proteinů je přidán imunoglobulin 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 oslí antilidský 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 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 ve screeningovém redení 1:16.

IgM DIL

IgM Sample Diluent, 15 mL

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

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 reagenциями 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 odběry opakujte po 2-4 týdnech kvůli kontrole změny titru.

POSTUP

Souprava obsahuje dostatek reagenčí 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 IgM Sample Diluentu pro všechna zatím netestovaná séra. Pro pozitivní séra z předchozích analýz, připravte sériové 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. Poznámka: Pozitivní kontrola nemá stejný titr pro antigen fáze 1 a fáze 2. Doporučujeme sérii ředění pozitivní kontroly od 1:2 do 1:32.
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. Vytřeptejeť puř ze sklíček.
6. Do každé jamky sklíčka přidejte 15 µl (1 kapku) konjugátu a vrate zpet do vlhké komurky a inkubujte 30 minut při 37[±] 0.5°C ve tme.
7. Promyjte skla dle bodu 5
8. Přidejte 2-3 kapky montovacího média na každé sklíčko a prikryte krycím sklem.
9. Odectete nabarvená sklíčka při 400x zvětšení vzhledem k intenzitě záření negativní a pozitivní kontroly. Pamatujte, že v mikroskopu je antigen fáze 2 na levé strane a antigen fáze 1 na strane 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 melo být testováno každý den. Jamky pozitivní kontroly by mely vykazovat konečný titr +/- jedno ředění od stanovených hodnot. Pro antigen fáze I je to 1:128, pro fázi II 1:512, za prepokladu že kontrola v lahvičce je ve screeningovém ředění 1:16. Pokud není kontrola v tomto limitu, analýza by měla být zrušena, reagenčie a pracovní postup by se mely znovu prekontrolovat a celý postup se musí zopakovat.

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

INTERPRETACE VÝSLEDKU

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

VZORKY PACIENTU

Pozitivní ve screeningovém redení 1:16: IgM titry 1:16 nebo vyšší proti fázi I nebo II jsou důkazem nedávné nebo akutní infekce. 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. burneti*. Další vzorek je vhodné vyšetřit v případe, kdy sérum bylo odebráno ihned po nástupu symptomu, hlavně pokud byla zahájena antibiotická léčba.

LIMITACE

IgM titry mohou přetrvávat více než rok a být následovány chronickým onemocněním (endokarditida nebo chronická hepatitida).

OCEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Rozšíření specifických protilátek je limitováno výskytem aktivní nebo nedávné infekce *C. burneti*. Titry IgM protilátek fáze I a II jsou často detekovány během prvního týdne po nástupu symptomu a vrcholu nabývají po 3-4 týdnech. Titry u nekomplikované Q horečky klesají po 10-12 týdnech, ale mohou přetrvávat déle u chronické choroby.

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