

ISTRUZIONI PER L'USO

Kit IFA per anticorpi IgG anti-*Coxiella burnetii*

Numero di catalogo	QG-120
Quantità	120 test
Conservazione	2-8°C

Test in immunofluorescenza per la rivelazione e la determinazione semi-quantitativa della classe di anticorpi IgG contro *Coxiella burnetii*, fase I e fase II, nel siero o nel plasma umano

Esclusivamente per uso diagnostico 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

URL: www.fullerlabs.com



MediMark Europe Sarl

11, rue Émile Zola - BP 2332

F-38033 Grenoble Cedex 2 - Francia

USO PREVISTO

Il kit IFA per anticorpi IgG anti-*Coxiella burnetii*, fase I e fase II, destinato alla rivelazione e determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgG contro *Coxiella burnetii*, è usato quale sussidio per la diagnosi dell'infezione umana da parte di quest'agente patogeno.

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Coxiella burnetii è un parassita batterico intracellulare delle cellule eucariotiche. La via più frequente d'infezione per gli uomini sono gli aerosol generati durante il parto di animali infetti o, meno frequentemente dal morso di zecche infette. Gli organismi inalati si diffondono sistematicamente dai polmoni, causando la febbre 'Q', una malattia a lenta risoluzione strettamente simile alla influenza. La malattia diventa cronica in circa il 5% dei casi, prevalentemente in forma di epatite cronica granulomatosa o, meno spesso, in endocarditi.

Vista, la perdita dei caratteristici sintomi nella fase acuta e la pericolosità insita nei tentativi di isolamento in laboratorio, i metodi sierologici sono stati il primo ausilio per la diagnosi clinica. I metodi IFA utilizzano la precipua variazione di fase riscontrata nella *C. burnetii* per differenziare le risposte anticorpali delle forme acute dalle convalescenti e dalle croniche. Diluizioni di siero del paziente sono simultaneamente fatte reagire in ogni pozzetto del vetrino con entrambi le fasi del microorganismo, fase I e fase II. Dopo lavaggio, per eliminare le proteine seriche che non hanno reagito, la reazione specifica viene marcata con immunoglobuline di classe specifica coniugate FITC. Dopo ulteriore incubazione il vetrino viene lavato per eliminare ogni eccesso di coniugato. La reazione risultante può essere osservata con un microscopio a fluorescenza; una reazione positiva è identificabile con fluorescenza chiaramente definita di colore verde mela dei corpi elementari con campo di contrasto rossastro del sacco vitellino sonificato. I campioni positivi possono essere analizzati a diluizioni superiori per determinare la massima diluizione positiva (titolo).

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

IFA Ag x 12

Vetrini con substrato (10)

Dieci vetrini con dodici pozzetti ciascuno contenenti *Coxiella burnetii*, con fase I sulla sinistra di ogni pozzetto e fase II sulla destra, (guardando il vetrino con l'estremità smerigliata sulla sinistra). Il substrato inattivato con formalina è fissato in acetone e confezionato sotto vuoto.

CONJ FITC

Coniugato per IgG, 2.5 mL

Flacone con contagocce, tappo giallo, contenente coniugato anti-umano di capra coniugato FITC (catena pesante specifica) con albumina bovina serica, 0,001% Thimerosal e contrastante blue Evans.

CONT +

Controllo Positivo, 0.5 mL

Flacone con contagocce, tappo blu, contenente siero umano alla diluizione di screening 1:16 con titolo ad end-point 1:128 (fase I) e 1:512 (fase II); contiene 0,001% Thimerosal.

CONT -**Controllo Negativo, 0.5 mL**

Flacone con contagocce, tappo rosso, contenente pool di sieri umani non reattivo alla diluizione di 1:16; contiene 0,001% Thimerosal.

SAMP DIL**Diluente campione IgG, 15 mL**

Tampone contenente siero di capra in tampone PBS.

MM**Tampone di Montaggio, 1 mL**

Flacone con contagocce, tappo bianco, contenente 50% glicerolo in PBS, pH 7,2 con 0,001% Thimerosal.

BUF WASH PBS**PBS, 1 litro**

Aggiungere il contenuto di una bustina ad 1 litro d'acqua purificata per ottenere la soluzione tampone a pH 7,2.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò, tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi; evitare il contatto con la pelle o l'ingestione.
- I vetrini substrato sono stati preparati con antigeni chimicamente inattivati. Devono comunque essere considerati potenzialmente infetti; manipolare con adeguata attenzione.

Modalità di conservazione e manipolazione

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Riportarli a temperatura ambiente prima dell'uso. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

Prelievo e preparazione dei campioni

Usare campioni di siero umano. Se il test viene fatto entro 24 ore dal prelievo, i campioni possono essere conservati tra 2-8°C, altrimenti devono essere aliquotati e congelati a -20°C o inferiore. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.* Per verificare la sierconversione, prelevare i campioni in fase acuta e in fase convalescente a 2, 4 settimane d'intervallo, confermare il cambio di titolo anticorpale.

PROCEDURA**Materiali forniti**

Il kit contiene reattivi e materiali sufficienti per 120 determinazioni.

Materiali Richiesti ma Non Forniti

- Acqua purificata (distillata o deionizzata)
- Vetreria da laboratorio da 250 o 500 mL per tampone di lavaggio PBS
- Provette o micropiastre per le diluizioni manuali
- Pipetta(e) di precisione per le diluizioni manuali
- Vetrini coprioggetto 24 x 50 mm
- Microscopio a fluorescenza con filtri per il sistema FITC (massima eccitazione lunghezza d'onda 490 nm, lunghezza d'onda di emissione media 530 nm) e 400X ingrandimento
- Incubatore a bagno d'acqua a 37°C
- Camera umida per passaggi di incubazione

Avvertenze

- Non usare alcun componente dopo la data di scadenza.
- Il coniugato è fotosensibile ed a protezione è confezionato in contenitore di plastica opaca. Conservare al buio e riporlo subito dopo l'uso.
- Il coniugato contiene blue Evans che può essere cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle.

PROCEDIMENTO

1. Per i campioni di siero dei pazienti preparare diluizioni di screening 1:16 in Diluente campione IgG. Per sieri, riconosciutamente positivi da precedenti analisi, preparare ulteriori diluizioni seriali in PBS.
2. Per il Controllo Positivo preparare diluizioni in PBS che includano una diluizione sopra ed una sotto di quella riportata come end-point (fase I = 1:128). Il controllo è confezionato con diluizione 1:64.
3. Dispensare, per ogni diluizione di siero, circa 15 µL in un pozzetto di reazione ed annotare la posizione per il successivo riferimento. Per ogni sessione d'analisi includere le diluizioni del siero di controllo positivo previste al punto 2, dispensare inoltre in un pozzetto (15 µL) di controllo negativo tal quale.
4. Riporre i vetrini in camera umida per 30 minuti a 37°± 0.5°C.
5. Rimuovere i vetrini dall'incubatore e dalla camera umida. Lavare i vetrini con un leggero flusso di PBS per tre volte. Lasciare i vetrini a bagno in PBS per almeno 5 minuti.
6. Rimuovere l'eccesso di PBS dai vetrini, eseguire il passaggio successivo evitandone la completa asciugatura.
7. Aggiungere ad ogni pozzetto una goccia (15 µL) di coniugato, riporre nuovamente i vetrini in camera umida nell'incubatore. Incubare 30 minuti a 37°± 0.5°C. L'incubazione dovrebbe essere fatta al buio per proteggere il coniugato fotosensibile.
8. Lavare i vetrini come al punto 5-6.
9. Aggiungere 2-3 gocce di liquido di montaggio ad ogni vetrino ed applicare il vetrino coprioggetto evitando di intrappolare bolle d'aria.
10. Leggere i vetrini con il substrato con ingrandimento 400X, comparando ogni pozzetto con quanto osservato sui pozzetti Positivo e Negativo. I vetrini possono essere conservati al buio e a 2-8°C per 24 ore.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il siero di Controllo Negativo e le diluizioni del siero di Controllo Positivo dovrebbero essere incluse in ogni sessione d'analisi. Il Controllo Negativo è un esempio di reazione negativa con sia il colore rossastro di contrasto distribuito uniformemente che con una leggera colorazione verdastra uniformemente diffusa. I pozzetti del Controllo Positivo dovrebbero dare un titolo ad end-

point compreso tra 1:64 e 1:256 (*fase I*) e tra 1:256 e 1:1024 (*fase II*). L'intensità di fluorescenza a 1:256 può essere usata come livello di cut-off per la definizione di positività di un campione in esame. Se per i controlli non si riscontrano i valori previsti la sessione d'analisi, deve essere invalidata e ripetuta, tutti i reattivi ed i passaggi della procedura devono essere verificati.

Il Controllo Negativo è un esempio di morfologia di una reazione negativa. Se la colorazione e la luminosità di questo pozzetto sono simili a quelle ottenute per il Controllo Positivo è indice di errore nella tecnica e la sessione d'analisi deve essere ripetuta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una reazione positiva appare come una luminosa colorazione (minimo 1+) dei corpi elementari con sfondo rossastro del materiale del sacco vitellino. Dimensioni delle particelle, apparenza e densità dei campi devono essere comparate con quanto ottenuto per il Controllo Positivo e Negativo. Morfologie e reattività differenti da quelle osservate nel controllo positivo devono essere considerate non-specifiche.

CAMPIONI DI SIERO

Positivo a 1:16 diluizione di screening: Titoli IgG di 1:16 o superiori degli organismi in *fase II* indicano un'infezione pregressa (sieropositivo). Nella maggioranza dei casi titoli degli organismi in *fase I* dovrebbero essere accompagnati da titoli equivalenti o maggiori di organismi in *fase II*. I sieri positivi dovrebbero essere titolati onde ottenere il valore di end-point per comparazione con valori precedenti o successivi dello stesso paziente.

Negativo a 1:16: Viene considerato negativo per anticorpi *Coxiella burneti*. Se il prelievo è avvenuto immediatamente dopo l'instaurarsi dell'infezione e in particolar modo se era in atto una terapia antibiotica si consiglia un ulteriore prelievo ed analisi.

LIMITAZIONI

L'organismo in *fase II* presenta sulla sua membrana cellulare dei ricettori-FC IgG. Il Diluente Campione IgG viene usato per saturare i ricettori con IgG non rilevabili di capra per permettere la reazione specifica delle IgG seriche umane. Elevati livelli di IgG seriche possono portare a bassi titoli non-specifici anche in presenza dello speciale diluente, perciò saranno associate specificamente con l'organismo in *fase II* e non accompagnate da titoli delle IgM o IgA.

EXPECTED VALUES

La prevalenza di specifici anticorpi varia in funzione della regione geografica e della popolazione che si sta osservando. Titoli IgG della *fase II* generalmente sono rilevabili entro la prima settimana dall'infezione e raggiungono il picco massimo attorno alla ottava settimana. Una vasta maggioranza di casi di febbre 'Q' acuta sono ancora positivi per la *fase II* IgG dopo un anno.

I titoli della *fase I* IgG, al contrario di quelli della *fase II*, sono molto spesso al di sotto dei livelli rivelabili se non vi sia in sviluppo la malattia cronica. L'epatite cronica è caratterizzata da alti ed equivalenti titoli della *fase I e II*, le endocarditi spesso hanno titoli della *fase I* più alti. Nella differenziazione delle

diagnosi può essere di aiuto valutare anche i titoli di classe IgM ed IgA.

REFERENCE

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

Revised 7/99