

ISTRUZIONI PER L'USO

Kit IFA per anticorpi IgM anti-*Coxiella burnetii*

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

Test in immunofluorescenza per la rivelazione e la determinazione semi-quantitativa della classe di anticorpi IgM 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 IgM anti-*Coxiella burnetii*, destinato alla rivelazione e determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgM contro *Coxiella burnetii*, fase I e fase II, 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 microrganismo, 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 IgM, 2.5 mL

Flacone con contagocce, tappo giallo, contenente coniugato antiumano di asino coniugato FITC (catena pesante) 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.

IgM DIL**Diluyente campione IgM, 15 mL**

Tampone contenente anticorpi anti IgG umane di capra in tampone PBS.

MM**Tampone di Montaggio, 1 mL**

Flacone con contagocce, tappo bianco, contenente glicerolo (50% v/v) in PBS, pH 7,2.

BUF WASH PBS**PBS, 1 litro**

Aggiungere il contenuto di una bustina ad 1 litro di acqua purificata per ottenere la soluzione tampone PBS 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 per massimi 5 giorni, altrimenti devono essere aliquotati e congelati a -20°C o inferiore. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.* 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.
- I reagenti liquidi contengono Thimerosal 0.01% che può essere tossico se ingerito.

PROCEDIMENTO

Portare tutti I reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

1. Per i campioni di siero dei pazienti preparare diluizioni di screening 1:16 con lo specifico diluente in dotazione 'Diluente campione IgM'. Per sieri, riconosciuti positivi da precedenti analisi, preparare ulteriori diluizioni seriali in PBS a partire dalla diluizione di screening preparata come sopra..
2. Per il Controllo Positivo preparare diluizioni seriali a partire da quella di confezionamento (1:64) diluendo 1.2, 1:4, 1.8, 1:16 per ottenere così le diluizioni 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 per comparazioni di specifici end-point. Note: Il Controllo Positivo non ha lo stesso titolo per gli antigeni di fase I e fase II. Per titolazioni seriali includere le diluizioni da 1:2 a 1:32 del Controllo Positivo.
3. Dispensare, per ogni diluizione di siero, circa 10 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 una goccia (10 µL) di controllo negativo tal quale.
4. Riporre i vetrini in camera umida per 30 minuti a 37°± 0.5°C
5. Rimuovere la camera umida dall'incubatore.
6. Lavare i vetrini con un leggero flusso di PBS per tre volte. Lasciare i vetrini a bagno in PBS per almeno 5 minuti.
7. Rimuovere l'eccesso di PBS dai vetrini, eseguire il passaggio successivo evitandone la completa asciugatura.
8. Aggiungere ad ogni pozzetto una goccia (10 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.
9. Lavare i vetrini come al punto 5-6.
10. Aggiungere 2-3 gocce di liquido di montaggio ad ogni vetrino ed applicare il vetrino coprioggetto evitando di intrappolare bolle d'aria.

11. 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. Notare che, nella visione al microscopio, l'antigene di fase II è sulla sinistra e quello di fase I sulla destra del campo di visione.

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 IgM di 1:16 o superiori verso sia la fase I o la fase II sono suppositive di malattia recente od in essere. 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

Per le malattie croniche (endocardite o epatite cronica) i titoli IgM possono persistere per oltre un anno.

EXPECTED VALUES

La prevalenza di anticorpi specifici è limitata a infezioni di *Coxiella burneti* recenti o in atto. Titoli IgM della fase I e II solitamente sono rilevabili entro la prima settimana dall'infezione ed il picco è raggiunto in 3-4 settimane. Se la febbre 'Q' non si complica i titoli decrescono in 10-12 settimane ma, per le malattie croniche, possono persistere per periodi molto più lunghi.

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