

ISTRUZIONI PER L'USO

Kit di anticorpi IgG per EIA dei *Rickettsia* del gruppo della febbre tifoidea

Numero di catalogo:	TFG-96K
Quantità:	96 test (12 x 8 pozzetti)
Conservazione:	2-8°C

Un test immunologico enzimatico indiretto per la rilevazione degli anticorpi di classe IgG contro i *Rickettsia* del gruppo del tifo nel siero o nel plasma umano.

Solamente per uso diagnostico *in vitro*.



FULLER LABORATORIES

1135 E. Truslow Ave. Fullerton, California 92831 USA
Telefono: +714-525-7660 Fax +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 di anticorpi IgG per EIA dei *Rickettsia* del tifo è destinato alla rilevazione degli anticorpi della classe IgG umana contro i *Rickettsia* del gruppo tifo, quale sussidio alla diagnosi dell'infezione umana da parte di tali agenti patogeni.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I *Rickettsia* del gruppo del tifo sono diffusi in tutto il mondo e mediati dalle feci di pulci e pidocchi infetti. L'infezione così prodotta induce una specifica risposta anticorpale, che può essere rilevata ed usata come mezzo indiretto di individuazione degli esseri umani infetti

I micropozzetti del modulo EIA compresi in questo kit utilizzano un antigene lipopolisaccaride (LPS) specifico di questo gruppo, estratto dai *Rickettsia typhi* (tifo murino), un membro del gruppo del tifo. Tra le altre specie che condividono tale reattività sierologica crociata sono comprese *Rickettsia prowazekii* (tifo esantematico) e *Rickettsia canadensis*. I sieri dei pazienti vengono diluiti con l'apposito diluente per campioni ed incubati nei micropozzetti rivestiti per permettere il legame degli anticorpi del siero all'antigene in fase solida. Successivamente, i pozzetti vengono lavati per rimuovere le proteine sieriche non reagite e l'IgG antiumano marcato con perossidasi (coniugato) viene addizionato per marcare l'anticorpo legato. Trascorso un ulteriore periodo di incubazione, i micropozzetti vengono lavati per rimuovere il coniugato non legato. Viene poi addizionato il substrato TMB per quantificare la porzione legata di perossidasi del coniugato. Il viraggio al blu è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo sierico reattivo. Questa reazione temporizzata viene interrotta con una soluzione di arresto che vira le reazioni blu al giallo e stabilizza l'intensità cromatica finale. Tale intensità cromatica (assorbanza) viene misurata alla lunghezza d'onda da 450 nm su un lettore per micropiastre o su uno spettrofotometro.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Modulo EIA da 96 micropozzetti

12 strisce x 8 micropozzetti, rivestiti con antigene LPS estratto da *Rickettsia typhi* e confezionate con essiccante, pronte per l'uso.

Diluente per campioni, 100 ml postdiluizione

Soluzione salina tamponata con fosfato, contenente albumina di siero bovino, Tween 20 e thimerosal (0,001% della concentrazione finale). Aggiungere il contenuto di un flacone in 90 ml di acqua distillata e far girare vorticosamente il contenitore per miscelare bene il tutto prima dell'uso.

Coniugato, 10,5 ml

IgG caprino antiumano marcato con HRP e purificato per affinità (catena pesante), fornito pronto per l'uso in un flacone color paglierino.
Proteggere dalla luce.

Controllo positivo, 100 ml

Siero umano reattivo, da diluirsi prima dell'uso come da istruzioni. Contiene lo 0,001% di thimerosal.

Calibratore, 100 ml

Siero umano reattivo in modo equivoco, da diluirsi prima dell'uso come da istruzioni. Contiene lo 0,001% di thimerosal.

Controllo negativo, 100 ml

Siero umano non reattivo, da diluirsi prima dell'uso come da istruzioni. Contiene lo 0,001% di thimerosal.

Substrato TMB, 6 ml

Una soluzione contenente H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB), fornita pronta per l'uso in un flacone paglierino. Proteggere dalla luce.

Soluzione di arresto, 12 ml

Acido solforico diluito pronto per l'uso. Può essere conservato a temperatura ambiente.

PBS, 1 litro

Aggiungere la confezione fornita in 1 litro di acqua purificata per produrre una soluzione salina tamponata con fosfato di pH 7,2. Miscelare bene.

Tween 20, 1 ml

Soluzione di 50% di Tween 20 e di 50% di PBS. Aggiungere 1 ml per litro di PBS per preparare il tampone di lavaggio. Tale tampone può essere conservato a temperatura ambiente.

Avvertenze

1. Per escludere la presenza di agenti infettivi, i sieri di controllo sono stati soggetti ai test imposti dall'ente statunitense FDA. Comunque, nessun metodo di analisi conosciuto può garantire l'assenza di agenti infettivi. Pertanto questi reagenti, come ogni siero ed attrezzatura che entri a contatto con tali campioni, vanno maneggiati in conformità alla buona prassi di laboratorio in modo da evitare il contatto con la pelle e l'ingestione.
2. Sebbene i micropozzetti siano rivestiti con antigeni disattivati, vanno considerati potenzialmente infetti e maneggiati di conseguenza.

Conservazione e maneggio

I componenti del kit vanno conservati a 2-8°C. Portarli a temperatura ambiente (20-25°C) prima di aprire i flaconi e le buste delle piastre. Le strisce di antigeni non utilizzate vanno reinserite e risigillate con cura nelle buste assieme all'essiccante.

PRELIEVO DEI CAMPIONI

Lasciar coagulare i campioni ematici e separare il siero tramite centrifugazione. Trasferire asepticamente il siero in contenitori sterili ermeticamente chiusi. Conservare a 2-8°C. Se i test vengono postposti per più di 5 giorni, conservare i campioni ad una temperatura pari o inferiore a -20°C. I campioni di soggetti acuti dovrebbero essere prelevati all'insorgenza della malattia e quelli dei convalescenti vanno prelevati ad intervalli di 2-4 settimane per verificare i cambiamenti di titolazione.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEI REAGENTI

1. Preparare il tampone di lavaggio aggiungendo il contenuto (1 ml) di un flacone di Tween 20 in 1 litro di PBS. Miscelare bene il tutto.
2. Preparare il diluente di lavoro per campioni aggiungendo il contenuto del flacone di diluente in 90 ml di acqua purificata. Miscelare con cura tramite inversione.
3. Preparare diluizioni 1:100 di tutti i campioni di siero dei pazienti e di tutti e tre (3) i sieri di controllo/calibrazione, usando il diluente di lavoro per campioni.

PROCEDURA

Il kit comprende reagenti e materiali sufficienti per 96 determinazioni.

Materiali richiesti ma non forniti

1. Acqua purificata (distillata o deionizzata)
2. Bottiglie o apparato automatico di lavaggio per EIA
3. Provette di test per diluizione manuale del siero o diluatore automatico per diluizioni 1:100
4. Pipette di precisione per gamma in microlitri
5. Coperchio adesivo o in plastica per incubazione di micropozzetti
6. Lettore EIA dotato di filtro da 450 nm.

Precauzioni

1. Non usare componenti scaduti.
2. Il substrato TMB ed il coniugato sono fotosensibili e sono confezionati in flaconi color paglierino a titolo di protezione. Conservarli al buio e riporli subito dopo l'uso.

PROCEDURA DI TEST

Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti ed i sieri prima di cominciare la procedura di test temporizzato.

1. Pipettare 100 µl di ciascun siero e controllo diluiti nei micropozzetti appropriati. Si consigliano pozzetti in duplicato per il calibratore di esclusione diluito.
2. Coprire i micropozzetti per ridurre al minimo l'evaporazione e poi **incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).**
3. Durante o prima dell'incubazione, **preparare il tampone di lavaggio aggiungendo il contenuto del flacone di Tween 20 in un litro di soluzione PBS.**
4. Lavare le piastre quattro (4) volte con un getto leggero di tampone di lavaggio emesso da una bottiglia di lavaggio o con un lavapiastre EIA multipozzetto, rimuovendo il tampone residuo dai pozzetti.
5. Aggiungere in ciascun micropozzetto 100 µl di coniugato enzimatico. Coprire ed incubare per **30 minuti al buio a temperatura ambiente.**
6. Lavare i micropozzetti come indicato nel precedente passo 4.
7. Temporizzando la sequenza, aggiungere in ciascun micropozzetto **50 ml di substrato TMB** e lasciar procedere la reazione **esattamente per 10 minuti** al buio.
8. Arrestare la reazione, secondo i tempi di sequenza di cui sopra, aggiungendo **100 ml di soluzione di arresto.**
9. Leggere l'assorbanza su un lettore per micropiastre munito di **filtro da 450 nm.**

CONTROLLO QUALITA'

Il calibratore in dotazione permette di discriminare i sieri reattivi da quelli non reattivi. L'uso migliore di questo controllo consiste nel definire la variazione intertest della regione equivoca. Se la misurazione di due o più pozzetti si attesta sul valore di esclusione, la regione equivoca dei valori di assorbanza giace tra i valori massimo e minimo indicati dal controllo. A titolo alternativo, dividendo i valori di densità ottica (DO) dei sieri testati per i valori DO del calibratore, si deriva un valore d'indice rispetto all'impostazione del calibratore, pari a 1,0. Indici da 0,8 ad 1,2 possono essere considerati equivoci (assumendo un CV percentuale del 20%). Gli indici superiori ad 1,2 sono positivi e quelli inferiori a 0,8 negativi.

LIMITAZIONI

Questa procedura rileva anticorpi specifici di gruppo ed è pertanto incapace di differenziare tra i membri del gruppo del tifo. In genere, non viene rilevata reattività al gruppo della febbre maculosa o al tifo delle boscaglie.

VALORI PREVISTI

La prevalenza di anticorpi specifici varia a seconda della regione geografica e della popolazione analizzata. Le aree endemiche risultano avere tassi sieropositivi del 7-26%, anche se alcuni casi sono certamente lievi o subclinici.

BIBLIOGRAFIA

1. La Scola, Bernard; Raoult, Didier. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2715 – 2727
2. Raoult, Didier; Gregory A. Datsch. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 2073 – 2079.

Versione A (19/4/2003)