

MODE D'EMPLOI

Kit Babesia divergens Screening IFA

Numéro de catalogue: DVG-120

Nombre de Tests: 120 tests

Conditions de stockage: 2-8° C

Immunofluorescence indirecte pour le dépistage des anticorps de classe IgG et IgM contre le **Babesia divergens** dans le sérum et le plasma Humains.

Réservé aux épreuves diagnostiques in vitro



1312 E.Valencia Dr.
Fullerton, Californie 92831 Etats-Unis
Téléphone : +1-714-525-7660
Fax : +1-714-525-7614
Email: info@fullerlabs.net
www.fullerlaboratories.com



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

USAGE ENVISAGÉ

Le kit **Babesia divergens IFA Screening** est destiné à la détection et la semi quantitation d'anticorps humain de la classe des IgG et IgM contre la Babesia divergens.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Le protozoaire **Babesia divergens**, transmis par la piqûre de tiques infectées est classé parmi une des causes connues de la babésiose humaine. Historiquement, le diagnostique se faisait à l'aide de la mise en évidence de l'intra érythrocytaire dans le frottis de sang périphérique, bien que les méthodes PCR sont de plus en plus mises à profit. La réponse sérologique de ces patients est spécifique à **Babesia divergens**, bien que l'agent du nouveau monde **Babesia sp** (MO1) et, dans une moindre mesure, le **Babesia venatorum** (EU-1) sont connus en réaction croisée. Le test IFA utilise des érythrocytes humains de type « O » infecté in vitro par des mérozoïtes B. divergens .

Les sérums des patients sont dilués dans un diluant de sérum et incubés dans les puits de lames individuels pour permettre la réaction de l'anticorps du patient avec les antigènes de Babesia divergens. Les lames sont ensuite lavées pour éliminer les protéines sériques n'ayant pas réagi et l'IgG + IgM (conjugué) anti-humains marqués par fluorescence est ajoutée. On laisse le temps à ce conjugué de réagir avec les complexes antigènes-anticorps, puis on lave les lames à nouveau pour éliminer le conjugué n'ayant pas réagi. On peut visualiser les réactions à l'aide d'un microscope à fluorescence standard, où une réaction positive apparaît comme des inclusions fluorescentes vert-pomme nettement définies dans les érythrocytes infectés. Les réactions positives peuvent ensuite être analysées à nouveau à des dilutions supérieures afin de déterminer la dilution la plus réactive ou la dilution finale.

REACTIFS

IFA Ag x 12

Lame de substrat(10)
10 x 12- lames à puits contenant des érythrocytes humains de type O+ fixes, infectés avec **Babesia divergens**, conditionnés sous vide.

CONJ FITC

IgG + IgM Conjugué, 2.5 mL
Un flacon compte-gouttes avec un bouchon jaune contient des IgG+IgM de chèvres anti-humaines marquées Alexafluor 488 purifié par affinité (chaîne lourde et légère) avec l'albumine de sérum bovin et le contre-colorant bleu d'Evans.

CONT +

Contrôle Positif, 0.5mL
Un flacon compte-gouttes avec un bouchon bleu contient du sérum humain réactif, fournit dans une dilution de dépistage à 1:64 avec un titre de point final de 1:512.

CONT -

Contrôle Négatif, 0.5mL
Un flacon compte-gouttes avec un bouchon rouge contient du sérum humain non-réactif à une dilution de 1:50.

MM

Milieu de montage, 1 mL
Un Flacon compte-gouttes à bouchon blanc contient 50% de glycérol dans le PBS.

BUF WASH PBS

PBS, 1 litre
Ajouter la poudre fournie à (1) litre d'eau purifiée pour produire une solution saline tamponnée au phosphate dont le pH est 7.2.

SAMP DIL

Diluant d'échantillon, 10mL
Le tampon contient le sérum de chèvre dans le PBS.

Avertissements

1. Les sérums de contrôle ont été testés pour les agents infectieux par les tests requis par la FDA. Étant donné qu'aucun test ne peut garantir l'absence d'agents infectieux, toutefois, ces réactifs, ainsi que tous les échantillons de sérum et le matériel en contact avec ces échantillons, doivent être manipulés avec les bonnes pratiques de laboratoire afin d'éviter l'ingestion ainsi que contact avec la peau.

2. Les lames de substrat sont préparées avec des antigènes chimiquement inactivés. Cependant, les lames doivent être considérées comme potentiellement infectieuses et sont traités en conséquence.

Stockage et Manipulation

Les composants du kit doivent être conservés entre 2 et 8 ° C. Veuillez les mettre dans un environnement à température ambiante (20 ° à 25 ° C) avant d'ouvrir les bouteilles ou les enveloppes de lames.

COLLECTE D'ÉCHANTILLON

Laisser les échantillons de sang se coaguler et séparer les sérums par centrifugation. Transférer les sérums de manière aseptique dans des récipients stériles à fermeture étanche. Conserver à 2-8 ° C. Si le test doit être retardé de plus de 5 jours, congeler les échantillons à -20 °C ou moins. Les échantillons aigus doivent être prélevés au début de la maladie; les échantillons convalescents doivent être obtenus à intervalles réguliers pour vérifier les modifications du titre.

PROCÉDURE

Le kit fournit suffisamment de matériel pour 120 déterminations.

Matériel Requis Mais Non Fourni

- Eau distillée ou déminéralisée
- Flacon de lavage propre de 250 ou 500 ml pour PBS
- Tubes de test ou plaque de microtitration pour dilutions de sérum
- Pipette (s) de précision
- Lamelles de verre de 24 x 50 mm
- Microscope à fluorescence avec système de filtration pour FITC (longueur d'onde d'excitation maximale de 490 nm, longueur d'onde d'émission moyenne de 530 nm) et un grossissement de 400X.
- Bain-marie ou incubateur à 37 °
- Enceinte humide pour les étapes d'incubation des lames.

Précautions

- Ne pas utiliser les composants après la date de péremption.
- Le conjugué est photosensible.
- Le conjugué contient le colorant bleu d'Evans, qui peut être cancérogène. Éviter le contact avec la peau.
- Les réactifs liquides contiennent du thimérosal à 0,001%, ce qui peut être toxique en cas d'ingestion.

Préparation des Réactifs

PBS: Ajouter le contenu du paquet à 1 litre d'eau purifiée. Mélanger jusqu'à dissolution complète des cristaux de sel.

PROCÉDURE DE TEST

Laisser tous les réactifs et sérums atteindre la température ambiante avant de commencer la procédure de test programmé.

1. Préparer les dilutions finales de dépistage au 1/64 dans du PBS pour tous les sérums de patients non testés. Il est suggéré de préparer les dilutions initiales au 1/8 dans du PBS, puis de les diluer au 1/8 dans du diluant d'échantillon. Pour les sérums trouvés positifs lors d'une analyse précédente, préparer des dilutions sériales dans du PBS, en commençant par 1:64.

2. Préparer les dilutions du contrôle positif de manière à inclure 1 dilution supérieure au point final indiqué et une dilution inférieure (p. Ex. 1: 256-1: 1024). Notez que ce contrôle est embouteillé à une dilution de 1:64.

3. Pour chaque dilution de sérum, appliquer 10 µL dans un puits de lame. Pour chaque analyse, inclure le contrôle négatif, le contrôle positif et les dilutions du contrôle positif préparés ci-dessus.

4. Mettre les lames dans une enceinte humide et incuber pendant 30 minutes à 37 °C ± 0,5 °C.

5. Retirer l'enceinte humide de l'incubateur et sortir le conjugué du stock. Rincer les puits à lames avec un léger jet de PBS d'un flacon de lavage. Agiter ou tapoter le PBS perlé des lames dans un évier, puis répéter cette étape de lavage 2X sans laisser les puits sécher.

6. Ajouter 1 goutte (10 µL) de conjugué dans chaque puits et remettre les lames dans l'enceinte humide pour une incubation de 30 minutes à 37° ± 0,5°C. L'incubation doit être dans l'obscurité pour protéger le conjugué photosensible.

7. Rincer les lames comme décrit à l'étape 5.

8. Ajouter 2-3 gouttes de milieu de montage sur chaque lame et couvrir avec un couvercle en verre.

9. Lire les lames de substrat colorées à un grossissement de 400X, en comparant chaque puits à l'intensité visuelle et à l'apparence des puits de contrôle positif et négatif. Les lames peuvent être conservées entre 2 et 8 °C dans l'obscurité pendant 24 heures.

CONTROLE DE QUALITÉ

Le sérum de contrôle négatif et les dilutions de contrôle positif doivent être testés à chaque exécution quotidienne. Le puits de contrôle négatif est un exemple d'un sérum non-réactif, avec une contre-coloration rouge uniforme ou légère, mais une coloration verdâtre uniforme. Les puits de contrôle positif doivent fournir un titre point final de 1:256 à 1:1024. L'intensité de fluorescence vert- pomme à 1:512 peut être utilisée comme niveau limite requis pour une réaction de patient considérée positive. Si aucun des contrôles ne réagit comme spécifié, l'opération de dépistage doit être considérée nulle, les réactifs et les étapes de la procédure doivent être revérifiés, et le test doit être répété à partir de l'étape #1.

Le puits de contrôle négatif est un exemple de motifs fluorescents considérés négatifs. Si des inclusions vert-pomme caractéristiques sont observées dans ce puits similaires à ceux observées dans les puits de contrôle positif, une erreur de manipulation s'est produite et le dépistage doit être répété.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une réaction positive apparait sous forme des inclusions intra-érythrocytaire fluorescentes de couleur vert pomme, varient de formes simples (formes d’anneau) aux formes complexes (tétrade). La taille, l'aspect et la densité de la réaction doivent être comparés avec les réactions de contrôle positif et négatif.

Dans les cas aigus, une prozone peut apparaître dans les titres d'IgG en raison de l'augmentation des titres d'IgM. Dans ce cas, des dilutions supplémentaires après la dilution de dépistage apparaîtront plus fortes et les titres d'IgM spécifiques refléteront cette compétition entre les isotypes d'immunoglobuline.

Échantillons de patients

Résultats positifs à une dilution de dépistage de 1:64: les titres d'IgG de 1:64 et plus sont considérés comme reflétant une infection récente ou active par ***Babesia divergens***. Les sérums positifs à la dilution de dépistage à 1:64 doivent être réexécutés pour déterminer les titres de point final à des fins de comparaison avec des échantillons antérieurs ou ultérieurs du même patient. Les titres d'IgM élevés, lorsqu'ils sont présents, sont un indicateur d'infection à une heure indéterminée.

Résultats Négatifs à 1:64: Signaler comme négatif pour l'anticorps Babesia. D'autres échantillons de sérum doivent être prélevés si l'original a été prélevé peu de temps après son apparition et si cette étiologie est toujours suspectée.
Sérum appariés: Une multiplication par quatre constatée sur le titre de IgG entre les échantillons de sérum aigus et convalescents supporte le diagnostique d'infection récente.

LIMITATIONS

La réaction croisée avec Plasmodium spp a été documentée dans la littérature. La réactivité croisée avec Babesia venatorum est possible avec des titres élevés.

RÉFÉRENCES

Krause, P. J., S. R. Telford 3rd, R. Ryan, P. A. Conrad, M. Wilson, J. W. Thomford, and A. Spielman. 1994. Diagnosis of babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of Babesia microti antibody. J. Infect. Dis. 169:923-926

Originale : 8/1999

Nouvelle version : 7/2018