

SYPH Ab

**ELISA souprava pro stanovení protilátek proti
Treponema pallidum neboli Syph Ab**

- Pouze pro diagnostiku "in vitro" -

96 testů

Kód: SIAB.CE

A. ÚVOD

Syfilis choroba přenosná pohlavním stykem způsobená bakterií *Treponema pallidum*, jež patří do čeledi Spirochaetaceae. *Treponema pallidum* je gramnegativní a je považována za striktně anaerobní. Vykazuje charakteristickou mobilitu pomocí periplasmického bičíku (flagely). Cytoplasma je chráněna stěnou buňky a cytoplasmatickou membránou. Syfilis je složité, akutní, chronické, infekční onemocnění s různými klinickými projevy, které závisí na stádiu infekce a individuální reakci. Doba inkubace se pohybuje mezi 10 dny a 3 měsíci a protilátky se obvykle detekují po 2 až 4 týdnech od primární léze.

Pro imunologickou detekci infekce bakterií *Treponema pallidum* bylo již vyvinuto mnoho testů (VDRL, TPHA, RPR), které se dodnes v diagnostických laboratořích používají.

V poslední době byla na vyšetřování v krevních bankách a na odděleních infekčních nemocí aplikována technologie ELISA, která umožňuje klinickým lékařům využívat automatické analytické nástroje a záznamy pro optické čtení.

B. PRINCIP ROZBORU

Mikrotitrační destičky jsou pokryty purifikovanými syntetickými antigeny *Treponema pallidum*.

Pevná fáze se napřed ošetří zředěným vzorkem a pokud v něm jsou přítomny protilátky, zachytí je. Po promytí se specificky navázané protilátky detekují pomocí protilátky IgG&M, silně reagující s lidskými antigeny, která je označena peroxidázou (HRP).

Přidá se roztok substrátu a chromogenu a intenzita zabarvení vyvolaná navázaným enzymem je přímo úměrná množství protilátek anti-T. *pallidum* ve vzorku. Výsledky se vyhodnocují pomocí vypočítaného koeficientu, kterým se odliší negativní výsledky od pozitivních.

C. PODMÍNKY TESTU A POZNÁMKY

1. Všechna činidla obsažená v této sadě jsou určena pouze pro použití při diagnostice "in vitro".
2. Sadu ani sloučeniny nepoužívejte po vypršení doby platnosti uvedené na nálepkách. Nemíchejte látky z různých sad mezi sebou.
3. Máte-li dostat spolehlivé výsledky i klinické interpretace, je nutné provádět všechny procesy velmi pečlivě.
4. Před začátkem testů ponechte všechny sloučeniny při pokojové teplotě po dobu alespoň 60 minut.

Kód: SIAB.CE

5. Zabraňte kontaminaci reagentů při jejich vyjímání z ampulí. Doporučujeme používat automatické pipety a špičky na jednorázové použití. Abyste se vyhnuli vzájemné kontaminaci, při dávkování reagentů se nedotýkejte hroty pipet mikrotitračních destiček.

6. Pro omývání používejte pouze promývací roztok dodávaný jako součást sady a pečlivě dodržujte všechny pokyny uvedené v kapitole "POKYNY PRO PROMÝVÁNÍ" tohoto příbalového letáku.

7. Postarejte se o to, aby se směs substrátu a chromogenu nedostala do kontaktu s oxidačními činidly nebo kovovými povrchy. Během inkubace nebo přípravy reagentu zabraňte osvětlení chemikálií prudkým světlem.

Pro přípravu směsi substrátu a chromogenu pro analýzu používejte pouze čisté nebo sterilní plastové nádoby na jedno použití.

8. Se vzorky a materiály potenciálně infekčními se musí nakládat opatrně, neboť mohou přenášet infekci.

Všechny předměty, které přišly do kontaktu se vzorky, a se zbytky po rozboru musí být ošetřeny nebo zlikvidovány jako potenciálně infekční. Nejlepší způsob inaktivace je ošetření v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 30 minut, nebo 2,5% roztokem chlornanu sodného po dobu 24 hodin. Tuto metodu můžete použít pro likvidaci tekutého odpadu poté, co byl neutralizován hydroxidem sodným (NaOH).

9. Vyhněte se jakémukoli kontaktu kapalin s pokožkou nebo sliznicí. V souladu s bezpečnostními předpisy, používejte vždy ochranné rukavice, brýle a laboratorní plášť.

D. OBSAH SOUPRAVY

a – Mikrotitrační destička s proužky 1 ks

12x8 proužků pokrytých syntetickým antigenem T. *Pallidum*. Destička je zabalena v zataveném sáčku s vysoušedlem. Před použitím ji ponechte při pokojové teplotě, abyste zabránili kondenzaci vlhkosti v sáčku.

b – Enzymatický konjugát (tracer) 1 ampule o 0,8 ml
Proteinový pufrový roztok obsahující specifickou protilátku anti-hIgG+M značená HRP, 20x koncentrovaný. Jako konzervační přísady obsahuje proteinové stabilizátory, 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,1% Kathonu GC.

c – Ředící roztok konjugátu 1 ampule o 16 ml

Proteinový pufr pro naředění koncentrovaného konjugátu. Jako konzervační přísadu obsahuje 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,1% Kathon

d – Promývací roztok 1 ampule o 60 ml

20x koncentrovaný roztok fosfátového pufru. Ředí se až 1 200 ml deionizované vody. Jako konzervační přísadu obsahuje Tween 20 a Kathon GC.

Pokud tento zředěný roztok skladujete při teplotě 4-8°C, bude stabilní jeden týden.

e – Chromogen (SOLN TMB) 1 ampule o 8 ml

Tento roztok obsahuje tetramethylbenzidin (TMB) s aktivátory a stabilizátory rozpuštěnými ve fosfát/citrátovém pufru.

Pozor: Skladujte v temnu.

f – Substrát (SOLN H₂O₂) 1 ampule 8ml

Roztok obsahuje stabilizovaný peroxid vodíku rozpuštěný ve fosfát/citrátovém pufru.

g – Stop roztok 1 ks ampule 15 ml

Obsahuje roztok 0,3 molární kyseliny sírové.

Pozor : Dráždivá látka! (Xi. R36/38 S2,26,30)

h – negativní kontrolní vzorek 1 ampule o 2 ml

Lidské sérum nereaktivní vůči protilátkám proti T. pallidum. Jako konzervační přísady obsahuje 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,1% Kathonu GC.

i – pozitivní kontrolní vzorek 1 ampule o 2 ml

Lidské sérum vysoce reaktivní vůči protilátkám proti T. pallidum. Jako konzervační přísady obsahuje 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,3% Kathonu GC.

l – Ředící roztok (DILSPE) 1 ampule po 50 ml

Proteinový roztok pro přípravu vzorků. Obsahuje detergent, proteinové stabilizátory, 0,1% azid sodný a 0,3% Kathon GC jako konzervační přísady.

m – Plastová fólie 2 ks

Průhledná víčka z plastu, určená pro zakrytí mikrotitračních destiček při inkubaci při teplotě +37°C.

Poznámka: Veškeré materiály vytvořené z lidského séra byly otestovány jako negativní na protilátky HbsAg, HCV a HIV testovacími sadami schválenými institutem FDA. Přesto však s těmito komponenty zacházejte jako s potenciálně infekčním materiálem.

E. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

1. Souprava musí být skladována při teplotě 2-8°C, a musí být použita před vypršením doby expirace uvedené na nálepce na obalu.
2. Nepoužité proužky musí být vráceny do sáčku s vysoušedlem a pevně uzavřeny lepicí páskou než budou uloženy při teplotě 2-8°C.
3. Po prvním otevření sáčku jsou proužky stabilní, dokud se vysoušedlo nezbarví růžově.
4. Zředěný promývací roztok je stabilní 1 týden nebo při teplotě 2-8°C.
5. Směs chromogenu a substrátu je stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě v temnu.
6. Zředěný konjugát je stabilní 1 týden při 2-8°C, pokud je skladován ve sterilní nádobě na jedno použití.
7. Všechny ostatní kapalné reagenty jsou stabilní při teplotách 2-8 °C, pokud se s nimi zachází tak, aby nedošlo ke kontaminaci.

F. NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

1. Mikropipety 10, 100 a 1000 µl.
2. Vortex a savé papíry.
3. Deionizovaná voda.
4. Stopky.
5. ELISA reader s alespoň 2 OD s filtry o optické hustotě 450 nm a 620-630 nm.
6. Inkubátor pro teplotu +37°C.
7. Automatická promývačka mikrotitračních destiček nebo ruční zařízení schopné dávat 300 µl a odsávat.

G. VZORKY

Pro analýzu je možno použít buď čerstvé sérum nebo plazmu.

Pokud se nepoužijí okamžitě, mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8°C po dobu 1 týdne. V případě delšího skladování, je zmrazte na teplotu -30°C.

Vzorky musí být čisté, a nesmí být kontaminované žádnými mikroorganismy. Nezmrazujte a nerozmrazujte vzorky více než jednou, protože IgM by se mohly zničit.

Pokud je to nutné, odstraňte znečišťující částice v centrifuze při 2 000 g x 20 min při pokojové teplotě, nebo filtrací přes filtr o hustotě 0,22 µ.

Vzorky vysoce lipemické, ikterické nebo hemolyzované se nesmějí používat, protože mohou dát chybné výsledky.

H. PŘÍPRAVA REAGENTŮ

a – Promývací roztok: Tento koncentrovaný roztok musí být před použitím dvacetinásobně rozředěn vodou vhodnou pro analýzu ELISA.

b - Konjugát: Rozřed'te koncentrovaný konjugát 1:20 ředícím roztokem pro konjugát. Jemně promíchejte na vortexu. Připravte jen množství nutné k testu.

c- Chromogen/Substrát: asi 5 minut pře použitím připravte tuto reagensii v plastové nádobě na jedno použití smícháním jednoho objemu Chromogenu s 1 objemem Substrátu. Připravte jen množství nutné k provedení testu.

I. POKYNY PRO PROMÝVÁNÍ

Chcete-li získat správná a přesná analytická data, je důležité dodržovat správný postup promývání. Proto doporučujeme používat dobrou promývačku mikrotitračních destiček ELISA, udržovanou v perfektním stavu.

Obecně platí, že máte-li mít jistotu, že neobdržíte falešné pozitivní reakce, a že získáte kvalitní základ pro další práci, postačí 4 až 5 čistících cyklů o 300 µl/jamku.

Přesto doporučujeme promývací systém kalibrovat pomocí jeho kalibrovací sady tak, aby splňoval příslušné uvedené parametry.

V případě manuálního čištění navrhujeme provádět 5 cyklů s použitím 300 µl/jamku a odsát kapalinu pětkrát.

V každém případě platí, že tato kapalina odsátá z proužků, smí být náležitým způsobem zlikvidována jako odpad teprve poté, co byla ošetřena roztokem chlornanu sodného s konečnou koncentrací 2,5 % po dobu 24 hodin.

J. PRACOVNÍ SCHEMA

Důležité poznámky:

Alespoň jednu hodinu před použitím přeneste všechny komponenty sady do prostředí s pokojovou teplotou a pečlivě promíchejte všechny kapalné reagenty ve vortexu.

Nemíchejte reagenty z různých výrobních šarží.

Doporučujeme dávkovat kalibrátory duplikovaně. Dávkování a doba inkubace musí být pro všechny jamky stejné. Vyhněte se delším přestávkám mezi jednotlivými kroky.

Doporučuje se odstranit přebytek promývacího roztoku jemným odsátím na podložce ze savého papíru.

Barva, kterou vzorek získá při inkubaci, je ve tmě stabilní maximálně po dobu jedné hodiny. Doporučujeme změřit mikrotitrační destičku při 450 nm (čtecí filtr) a slepý test (blank) při 620-630 nm. Jamku A1 použijte jako BLANK.

Provedení testu na automatu:

V případě, že se testování provádí automatickým systémem pro ELISA doporučujeme, aby bylo zařízení nastaveno tak, aby nasálo 240 μ l ředícího roztoku a pak 10 μ l vzorku.

Pak se celá směs přesně nadávkuje přímo do příslušné jamky na mikrotitrační destičce.

Kontrolní vzorky neředte, jsou již připraveny k přímému použití.

Do příslušných jamek dejte 250 μ l kontrolních vzorků.

U dalších operací se řiďte níže uvedenými pokyny pro práci.

Důrazně doporučujeme zajistit, aby čas, uplynulý mezi jednotlivými operacemi dávkování prvního a posledního vzorku, byl přesně spočítán, a aby byl vzat v úvahu při načasování prodlevy k první promývací operaci.

Manuální provedení testu

1 – jamku A1 ponechejte prázdnou, bude sloužit jako slepý testu (blank).

Do příslušných jamek rozdělte po 250 μ l Negativního a Pozitivního kontrolního vzorku – duplikovaně. Kontrolní vzorky neředte, protože již jsou zředěny tak, aby byly připraveny k přímému použití.

Do všech jamek pro testované vzorky rozdělte po 240 μ l Ředícího roztoku. Pak do každé, správně označené jamky, rozdělte po 10 μ l vzorku. Při opatrném promíchávání dávejte pozor na to, aby jamky nepřetekly a nekontaminovaly sousední jamky.

Nakonec mikrotitrační destičku inkubujte **po dobu 60 minut při teplotě +37 °C**.

2 – Sejměte kryt a promyjte mikrotitrační destičku podle instrukcí. V mezičase si připravte konjugát zředěním 1:20 viz výše.

3 – Přidejte 100 μ l enzymatického konjugátu do všech jamek, kromě jamky A1. Zakrytou mikrotitrační destičku inkubujte po dobu **30 min při +37°C**.

4 – Sejměte kryt a promyjte mikrotitrační destičku podle instrukcí. V mezičase připravte směs Chromogen/Substrát viz výše.

5 – Přidejte 100 μ l směsi chromogenu a substrátu do všech jamek včetně A1. Inkubujte mikrotitrační destičku po dobu **15 min při pokojové teplotě**. Chraňte destičku před světlem.

6 – Zastavte enzymatickou reakci přidáním 100 μ l stop roztoku do všech jamek včetně jamky A1. Změřte mikrotitrační destičku readerem ELISA při 450 nm a 620-630 nm, jamku A1 použijte jako BLANK.

M. PLATNOST ANALÝZY

Kód: SIAB.CE

Test je považován za platný, pokud:

1. Hodnota OD450nm jamky A1 pro slepý test je menší než 0,100.
2. Po odečtení blanku A1, je při hustotě filtru OD450nm průměrná hodnota negativního kontrolního vzorku (NC) menší než 0,200.
3. Při hustotě filtru OD450nm je průměrná hodnota pozitivního kontrolního vzorku (PC) větší než 0,800.

V případě, že výše uvedená data neodpovídají správným hodnotám, zkontrolujte před opakováním testu datum expirace použité sady, funkčnost nástrojů použitých pro práci při testu, a postup rozdělování reagentů a vzorků do jamek.

N. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Pokud se ukáže, že test je platný, vypočítejte hodnotu koeficientu (C_o) podle následujícího vzorce:

$$NC + 0.200 = \text{koeficient}$$

Vzorky s hodnotou OD 450 nm nižší než koeficient se považují za negativní na protilátky proti T. pallidum.

Vzorky s hodnotou OD 450 nm mezi hodnotou koeficientu a hodnotou koeficientu zvýšenou o 20% ($C_o + 20\%$) se považují za vzorky z šedé zóny a pacient by měl být nedále sledován.

Vzorky s hodnotou OD 450 nm vyšší než horní hranice šedé zóny se považují za pozitivní na protilátky proti T. pallidum.

Příklad výpočtu:

Negativní kontr. vzorek OD450nm = 0.050 (NC)

Pozitivní kontr. vzorek OD450nm = 1.200

koeficient = $NC + 0.200 = 0.250$

Šedá zóna = $C_o + 20\% = 0,250 - 0,300$

Vzorek č. 1 OD450nm = 0.080 negativní

Vzorek č. 2 OD450nm = 1.158 pozitivní

O. PARAMETRY TESTU

CITLIVOST: Citlivost testu byla vypočítána na panelu serokonverzních a pozitivních vzorků porovnáním se sadou schválenou institutem FDA pro prodej na trhu. Tento test vykazuje citlivost vyšší než 98 %.

Tato sada má citlivost srovnatelnou s titrem 1 : 80 analýzy Fujirebio, která je založená na klasické hemoaglutinaci.

PŘESNOST: Citlivost testu byla stanovena pomocí panelu negativních a pozitivních vzorků vyšetřených pomocí sady prodávané na trhu a schválené FDA. Tento test vykazuje citlivost vyšší než 98 % pro plazmu a pro sérum.

REPRODUKOVATELNOST: Reprodukovatelnost byla stanovena pomocí negativních a pozitivních kontrol opakovaně testovaných v různé dny. V

závislosti na hodnotě OD450nm byly obdrženy kontrolní hodnoty mezi 4 – 12 %.

P. LITERATURA

1. Coffe E. et al.. (1980) Serological Tests for syphilis. In Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
2. Jaffe H.W. et al.. (1978) Arch.Intern.Med. 138: 252-255
3. Jaffe H.W. et al.. (1978) Am.J.Clin.Pathol. 70: 230-233
4. Matthews H.M. et al.. (1979) Infect.Immun. 24: 713-719
5. Shore R.N. et al.. (1974) Arch.Dermatol.109: 854-857
6. Sparling P.F. (1971) N.Engl.J.Med. 284: 642-653
7. Rupli T. (1989) Dermatologica 179: 113-117
8. Rolf T.R. et al.. (1990) JAMA 264: 1432-1437

Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l. pod dohledem zřízeným systémem řízení jakosti a prostředí, který splňuje požadavky norem UNI EN ISO 9001:1994-UNI CEI EN 46001:1996, a který byl certifikován TUV pod registračním číslem 501002033/A a 501002033/B

Vyrábí			
Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl. via Columella n° 31 – Milano - Italy			
Doc.:	INS SIAB.CE	Verze:	10/02
Schválil ved. odd' jakosti:		M. Marchisio	

Distributor:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno

Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114

e-mail: laboserv@laboserv.cz