

SYPH IgM

Sada pro enzymatickou imunoanalýzu pro stanovení protilátek IgM proti *Treponema pallidum* neboli Syph IgM

- Pouze pro diagnostiku "in vitro" -

96 testů

Kód. SIM.CE

A. ÚVOD

Syfilis choroba přenosná pohlavním stykem způsobená bakterií *Treponema pallidum*, jež patří do čeledě 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 IgM, zachytí je. Po promytí se specificky navázané protilátky detekují pomocí protilátky proti IgM, 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 IgM proti *T. pallidum* ve vzorku.

Interference, které by mohly být způsobené přítomností IgG a Rheumatioidním faktorem, se blokuje přidáním Neutralizačního reagentu do jamky.

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.

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-hIgM značená HRP, 20x koncentrovaný. Jako konzervační přísady obsahuje proteinové stabilizátory, 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,3% Kathonu GC.

c - Ředící roztok pro enzym. konjugát 1 ampule o 16 ml
Proteinový pufr pro naředění koncentrovaného konjugátu. Obsahuje proteinové stabilizátory, 0,2 mg/ml sulfátu gentamicinu a 0,1% Kathon GC jako konzervační látky.

d – Koncentr. promývací roztok 1 ampule o 60 ml
20x koncentrovaný roztok fosfátového pufru. Ředí se až 1 200 ml vody. Jako konzervační přísadu obsahuje fosfátový pufr Tween 20 a Kathon GC.

Zředěný roztok je stabilní jeden týden při teplotě 2°-8°C

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 - Substrate (SOLN H₂O₂) 1 ampule o 8 ml

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

g – Stop roztok 1 ks ampule 16 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 0,3% Kathonu GC. Negativní kontrola je označena světle žlutou barvou.

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. Pozitivní kontrola je označena zelenou barvou.

l – Ředící roztok (DILSPE) 2 ampule po 60 ml

Proteinový roztok pro přípravu vzorků. Obsahuje detergent, proteinové stabilizátory, 0,09% azid sodný a 0,1% Kathon GC jako konzervační přísady.

m – Neutralizační činidlo (DILNEUT) 1 ampule o 8 ml

Pufrovaný proteinový roztok pro neutralizaci interferencí způsobených IgG a reumatoidním faktorem (RF). Obsahuje 0,09 % azidu sodného a 0,1 % Kathonu GC.

j – 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. Pozitivní a cut-off kontroly byly inaktivovány na HCV. 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 dřívě, 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 při pokojové teplotě po dobu jednoho týdne nebo při teplotě 2-8°C po dobu 3 týdnů.
5. Směs chromogenu a substrátu je stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě v temnu.
6. Zředěný konjugát je stabilní 1 týden při teplotě 2-8°C, pokud je skladovaný ve sterilní nádobě na jedno použití.
7. Všechny ostatní kapalně 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 by se neměly používat, protože mohou dát chybné výsledky.

Vzorky vykazující vysoký titr RF mohou při analýze generovat falešné pozitivní výsledky.

H. PŘÍPRAVA REAGENTŮ

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

b - Konjugát: Rozřeďte koncentrovaný konjugát 1:20 ředícím roztokem pro konjugát. Jemně promýchejte na vortexu. Připravte si jen množství nutné k provedení testu.

c - Chromogen/Substrát: Asi 5 minut před použitím připravte tuto reagensii v plastové nádobě na jedno použití podle potřeby smícháním 1 objemu Chromogenu s 1 objemem Substrátu. Připravte pouze 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 SCHÉMA

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 svého 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.

1 - Jamku A1 ponechte prázdnou jako blank. Rozředte vzorky v poměru 1:101 pomocí ředícího roztoku (10 µl vzorku + 1 000 µl ředícího roztoku). Neředte kontroly, protože jsou již zředěny předem a jsou připraveny k přímému použití. Dávkujte 50 µl Neutralizačního činidla do každé jamky pro vzorek, vynechte jamku A1 a jamky pro kontroly. Doporučujeme rozdělit kontroly a vzorky do jamek podle následující tabulky:

pozice	kalibrátor/vzorek
A1	jamka pro slepý test (blank)
B1+C1	100 µl negativní kontrolní vzorek
D1	100 µl pozitivní kontrolní vzorek
E1.....H12	100 µl testované vzorky

Mikrotitrační destičku přikryjte krytem, a inkubujte při **+37°C po dobu 60 minut.**

2 - Sejměte kryt a promyjte destičku podle instrukcí popsanych výše. V mezičase připravte enzymatický konjugát ředěním 1:20 jak je popsáno výše.

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

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

5 – Přidejte 100 µl 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 µl stop roztoku do všech jamek včetně jamky A1. Změřte mikrotitrační destičku readerem ELISA při 450 nm a 620-630 nm, proužek A1 použijte jako BLANK.

Kód SIM.CE

M. PLATNOST ANALÝZY

Test je považován za platný, pokud:

- Hodnota OD450nm jamky A1 pro slepý test je menší než 0,100.
- Po odečtení blanku, je při hustotě filtru OD450nm průměrná hodnota negativního kontrolního vzorku (NC) menší než 0,200.
- Při hustotě filtru OD450nm je průměrná hodnota pozitivního kontrolního vzorku (PC) vyšší 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 byl platný, vypočítejte hodnotu koeficientu (Co) podle následujícího vzorce:

$$NC + 0.250 = \text{koeficient (Co)}$$

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

Vzorky s hodnotou OD 450 nm mezi hodnotou koeficientu a Co+20% se považují za vzorky z šedé zóny.

Vzorky s hodnotou OD 450 nm vyšší než Co +20% se považují za pozitivní na protilátky IgM proti T. pallidum.

Příklad výpočtu:

Negativní kontr. vzorek OD450nm = 0.050 (NC)

Pozitivní kontr. vzorek OD450nm = 1.200

koeficient = NC+0.250 = 0.300

Šedá zóna = 0,300-0,360

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 %.

PŘESNOST: Citlivost testu byla stanovena pomocí panelu negativních a pozitivních vzorků klasifikovaných 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. REFERENCES

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. Mattews 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 9002-UNI CEI EN 46002, a který byl certifikován TUV pod registračním číslem 501001146

Vyrábí :

Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl.
via Columella n° 31 – Milano - Italy

Doc.:	INS SIM.CE	Šarže:	04/03
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