

IVD

Návod k použití (česky)

1 Určený účel

Test *recomLine Treponema IgG, IgM* je kvalitativní test k prokazování IgG a IgM protilátek proti *Treponema pallidum* v lidském séru nebo v lidské plazmě.

2 Oblast použití

Test *recomLine Treponema IgG, IgM* lze používat jako potvrzovací test vzorků, které byly při screeningu reagovaly.

Test *recomLine Treponema IgG, IgM* je tzv. linkový imunologický test. Princip testu umožňuje díky oddělenému nalinkování jednotlivých antigenů na rozdíl od testu ELISA identifikaci specifických protilátek proti jednotlivým antigenům *Treponema pallidum*. V testu se používají rekombinantně získávané protilátky: Tp47, TmpA, Tp257 (Gpd), Tp453, Tp17 a Tp15.

3 Princip testu

Vysoce čištěné rekombinantní protilátky proti bakterii *Treponema* jsou fixované na testovacím proužku s membránou z nitrocelulózy.

1. Testovací proužky se inkubují zředěným vzorkem séra nebo plazmy, přičemž se na antigenech patogenu na testovacích proužcích usadí specifické protilátky.
2. Nevázané protilátky se následně smyjí.
3. V druhém kroku se proužky inkubují antihumánními protilátkami imunoglobulinu (IgG, resp. IgM), na které je navázaná křenová peroxidáza.
4. Nevázané konjugované protilátky se následně smyjí.
5. Pomocí barvicí reakce katalyzované peroxidázou se prokáží specificky vázané protilátky. Pokud dojde k reakci antigenu s protilátkou, objeví se na příslušném místě na proužku tmavý pás.

Na horním konci testovacích proužků se nacházejí kontrolní pásy:

- a) Kontrola reakce pod číslem proužku, která musí u každého vzorku séra/plazmy reagovat.
- b) Kontroly konjugátu (IgG, IgM) slouží ke kontrole použitého typu konjugátu a proužku (podle třídy Ig). Pokud se k prokázání IgG protilátek používá specifický testovací proužek pro IgG, zobrazuje se v kontrolním pásu konjugátu IgG jasná reakce; v případě specifického testu IgM se pozitivní reakce musí zobrazit v kontrolním pásu IgM.
- c) „Cut-off kontrola“: Intenzita tohoto pásu umožňuje posoudit reaktivitu jednotlivých antigenových pásů (viz 9.2 Vyhodnocení).

4 Reagencie

4.1 Obsah balení

Reagencie v jednom balení stačí na 20 (100) stanovení.

Každá sada reagiencí obsahuje:

WASHBUF A 10 X	100 ml (5 x 100 ml) promývací pufr A (desetinásobně koncentrovaný) Obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, konzervační prostředek: MIT (0,1%) a oxyprion (0,2%)
SUBS TMB	40 ml (5 x 40 ml) chromogenní substrát tetramethylbenzidin (TMB, připravený k použití)
MILKPOW	5 g (5 x 5 g) sušeného odstředěného mléka
INSTRU	1 návod k použití
EVALFORM	1 (5) hodnotící arch/archů

4.1.1 recomLine Treponema IgG

Každá sada reagiencí obsahuje vedle složek uvedených v bodě 4.1 navíc:

TESTSTR	2 (10) trubičky/trubiček, každá s 10 očíslovanými testovacími proužky
CONJ IgG	500 µl (5 x 500 µl) antihumánního IgG konjugátu (stonásobně koncentrovaného, zelené víčko) Králičí, obsahuje NaN ₃ (< 0,1%), MIT (< 0,1%) a chloracetamid (< 0,1%)

4.1.2 recomLine Treponema IgM

Každá sada reagiencí obsahuje vedle složek uvedených v bodě 4.1 navíc:

TESTSTR	2 (10) trubičky/trubiček, každá s 10 očíslovanými testovacími proužky
CONJ IgM	500 µl (5 x 500 µl) antihumánního IgM konjugátu (stonásobně koncentrovaného, fialové víčko) Králičí, obsahuje NaN ₃ (< 0,1%), MIT (< 0,1%) a chloracetamid (< 0,1%)

4.2 Další potřebné reagencie, materiály a přístroje

- Inkubační misky (lze v případě potřeby objednat od firmy MIKROGEN)
- Deionizovaná voda (vysoké kvality)
- Plastová pinzeta
- Horizontální třepačka
- Vortex mixer nebo jiné rotátory
- Vakuová pumpa nebo odpovídající přístroj
- Měřicí válec, 50 ml a 1000 ml
- Mikropipety s jednorázovými hroty, 20 µl a 1000 µl
- 10 ml pipeta nebo dispenzer
- Časovač
- Savé papírové utěrky
- Jednorázové ochranné rukavice
- Nádobna na nebezpečný biologický odpad

5 Trvanlivost a manipulace

- Reagencie před použitím a po použití skladujte při teplotách +2 – +8 C°, **nezmrazujte**.
- Před zahájením testu všechny složky minimálně na 30 minut temperujte na pokojovou teplotu (+18 – +25 C°). Test se provádí při pokojové teplotě.
- Stejně reagencie (viz natištěný symbol) různých testů *recomLine* a *recomBlot* lze používat pro různé parametry a s různými šaržemi. Přitom je nutné dbát na trvanlivost těchto komponent.
- Koncentrované reagencie a séra pacientů před použitím dobře promíchejte. Zabraňte pění.
- Trubičku s testovacími proužky otevřete až bezprostředně před použitím, aby se předešlo tvorbě kondenzátu. Nepotřebné proužky zůstávají v trubičce a skladují se nadále při teplotě +2 – +8 C° (trubičku opět dobře uzavřete, testovací proužky nesmí před zahájením testu zvlhnout!).
- Proužky jsou označeny pořadovým číslem a zkratkou testu.
- Na obalu je uvedeno datum spotřeby, při jeho překročení přestává platit záruka jakosti.
- Součástí setu chraňte během celé doby testování před přímým slunečním světlem. Zejména roztok substrátu (TMB) je citlivý na světlo.
- Test smí provádět pouze školený a autorizovaný odborný personál.
- Pokud by uživatel provedl podstatné změny výrobku, resp. pokynů k jeho použití, mohlo by se pak jednat o používání mimo účel použití určený společností MIKROGEN.
- Křížová kontaminace vzorků pacientů nebo konjugátů může vést k falešným výsledkům testů. Doplněte vzorky pacientů, testovací proužky a roztok konjugátu opatrně. Dbejte na to, aby nebyly inkubační roztoky zaneseny do jiných prohlubní. Tekutiny odstraňujte opatrně.
- Proužky musí být během celé procedury kompletně navlhčené a ponořené.
- Automatizace je možná, bližší informace obdržíte od firmy MIKROGEN.

6 Varování a bezpečnostní opatření

- Používejte pouze k *in vitro* diagnostice.
- S veškerými krevními produkty je nutné zacházet jako s potenciálně infekčními.
- Testovací proužky byly vytvořeny s inaktivovanými bakteriálními nebo virovými antigeny.
- Po přidání materiálu od pacienta nebo kontrolního materiálu je nutné na proužek nahlížet jako na potenciálně infekční a odpovídajícím způsobem s ním zacházet.

- Během celé doby testování je nutné používat vhodné jednorázové rukavice.
- Reagencie obsahují antimikrobiální prostředky a konzervační látky azid sodný, MIT (methylišothiazolon), oxyprion, chloracetamid a peroxid vodíku. Zabraňte kontaktu s kůží nebo sliznicí. Acid sodný může při kontaktu s těžkými kovy, jako je měď a olovo vytvářet výbušné azidy.
- Veškeré odsávané tekutiny je nutné shromažďovat. Všechny sběrné nádoby musejí obsahovat vhodné dezinfekční přípravky k inaktivaci humánní patogenních zárodků. Veškeré reagencie a materiály, které přijdou do styku s potencionálně infekčními vzorky, je nutné ošetřit vhodnými dezinfekčními přípravky nebo zlikvidovat v souladu s hygienickými předpisy. Je nutné vzít v úvahu údaje o koncentracích a inkubační doby stanovené výrobcem.
- Inkubační misky použijte jen jednou.
- S proužky opatrně manipulujte plastovou pinzetou.
- Reagencie nenahrazuje ani nemíchejte s reagentii od jiných výrobců.
- Před provedením testu si pečlivě přečtěte a dodržujte kompletní návod k použití. Odchytky od protokolu testu uvedeného v návodu k použití mohou vést k chybným výsledkům.

7 Odběr vzorku a příprava reagentií

7.1 Testovaný materiál

Testovaným materiálem může být sérum nebo plazma (citrát, EDTA, heparin, CPD), které je nutné po odběru co nejrychleji oddělit od krevního koláče, aby se předešlo hemolýze. V každém případě je nutné zabránit mikrobiální kontaminaci vzorku. Nerozpustné látky je nutné před inkubací ze vzorku odstranit. Použití teplem inaktivovaných, ikterických, hemolytických, lipemických nebo kalných vzorků se nedoporučuje.

Pozor!

Pokud nechcete testy provádět ihned, lze testovaný materiál uchovávat po dobu 2 týdnů při teplotě +2 – +8 C°. Delší skladování vzorků je možné při teplotě –20 C° a nižší. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků se kvůli nebezpečí chybných výsledků nedoporučuje.

7.2 Výroba roztoků

7.2.1 Výroba hotového promývacího pufru A

Tento pufr je zapotřebí ke zředění séra a konjugátu a k promývání. Před zředěním je nutné určit objem promývacího pufru A pro příslušný počet prováděných testů.

Sušené odstředěné mléko se nejprve předem rozpustí v koncentrátu promývacího pufru A a tato směs se pak doplní deionizovanou vodou na konečný objem (ředění 1 + 9). Potřebná množství pro definovaný počet testovacích proužků se zjišťují výpočtem podle následujících vzorců (mrtvý objem specifický pro dané zařízení není zohledněn):

Reagencie	Vzorec	Příklad: 5 proužků
Sušené odstředěné mléko [g]	= počet proužků × 0,1	0,5 g
Koncentrát promývacího pufru [ml]	= počet proužků × 2	10 ml
Deionizovaná voda [ml]	= počet proužků × 18	90 ml
Hotový promývací pufr A [ml]	= počet proužků × 20	100 ml

Hotový promývací pufr A lze skladovat při teplotě +2 – +8 C° po dobu čtyř týdnů. Hotový promývací pufr A je bez zápachu a mírně zakalený.

7.2.2 Výroba roztoků konjugátu

Roztok konjugátu se připravuje krátce před použitím, hotový roztok konjugátu nelze skladovat.

Část koncentrátu konjugátu se zředí 100 díly hotového promývacího pufru A (1 + 100).

Potřebná množství pro definovaný počet testovacích proužků se zjišťují výpočtem podle následujících vzorců:

Reagencie	Vzorec	Příklad: 5 proužků
Koncentrát konjugátu [μl]	= počet proužků × 20	100 μl
Hotový promývací pufr A [ml]	= počet proužků × 2	10 ml

Množství konjugátu jsou vypočtena bez mrtvého objemu. Podle zpracování (manuálně, resp. na přístroji) prosím nasadte dodatečný roztok konjugátu pro 1 až 3 proužky.

8 Testovací metoda

8.1 Hodinová inkubace séra

Č.	Provedení	Poznámka
1	Před zahájením testu všechny reagencie minimálně na 30 minut temperujte na 18 – 25 C° (pokojová teplota).	Test se provádí při pokojové teplotě.
2	<u>Příprava testovacích proužků</u> Naložte proužky do 2 ml hotového promývacího pufru A. Důležité: Proužky IgG a IgM nelze zaměňovat!	Nesahejte na proužky holými rukama – použijte pinzetu. Číslo proužku směruje nahoru. Pro každý proužek je zapotřebí jedna prohlubeň v inkubační misce (viz 4.2). Proužky musejí být kompletně ponořené.
3	<u>Inkubace vzorku</u> a) 20 μl nezředěného vzorku (humánní sérum nebo plazma) se v závislosti na inkubačním nastavci napipetuje na testovací proužek. (ředění 1 + 100) b) Inkubujte po dobu 1 hodiny za mírného třepání	Vzorek pipetujte na jednom konci ponořeného proužku do promývacího pufru A a co nejrychleji opatrným protřepáním inkubační vaničky promíchejte. Inkubační misku zakryjte plastovým víkem a postavte na třepačku.
4	<u>Promývání</u> a) Opatrně sejměte plastové víko z inkubačních misek. b) Zředěné sérum opatrně odsajte z jednotlivých prohlubní. c) 2 ml hotového promývacího pufru A přeneste pipetou do každé prohlubně, na 5 minut promývejte za mírného třepání a následně promývací roztok A odsajte.	Kroky promývání 8.4a – 8.4c proveďte celkem třikrát. Zabraňte křížové kontaminaci. Při strojním zpracování je nutné dbát příslušných pokynů výrobce přístroje.
5	<u>Inkubace s konjugátem</u> Přidejte 2 ml hotového konjugáčního roztoku a 45 minut za mírného třepání inkubujte.	Inkubační misku zakryjte plastovým víkem a postavte na třepačku.
6	<u>Promývání</u> viz bod 8.4	Kroky promývání proveďte celkem třikrát (8.4a – 8.4c).
7	<u>Reakce substrátu</u> Přidejte 1,5 ml hotového substrátového roztoku a 8 minut za mírného třepání inkubujte.	
8	<u>Zastavení reakce</u> Odstraňte substrátový roztok Minimálně třikrát krátce vymyjte deionizovanou vodou.	
9	<u>Sušení proužků</u> Proužky před vyhodnocením 2 hodiny sušte mezi 2 vrstvami svého papíru.	Proužky opatrně vyjměte plastovou pinzetou z vody. Proužky uchovávejte chráněné před světlem.
Pozor! Inkubační roztoky se nesmí zanést do jiných prohlubní. Zejména při otvírání a zavírání víka je nutné zabránit rozstříku.		

8.2 Tříhodinová inkubace séra

Test lze případně provést s tříhodinovou inkubací séra. Od postupu popsaného v bodě 8.1 se provedení liší pouze v bodě 3a) a 3b).

3	<u>Inkubace vzorku</u> a) 10 μl nezředěného vzorku (humánní sérum nebo plazma) se v závislosti na inkubačním nastavci napipetuje na testovací proužek. (ředění 1 + 200) b) Inkubujte po dobu 3 hodin za mírného třepání.	Vzorek pipetujte na jednom konci ponořeného proužku do promývacího pufru A a co nejrychleji opatrným protřepáním inkubační vaničky promíchejte. Inkubační misku zakryjte plastovým víkem a postavte na třepačku.
---	--	--

9 Výsledky

Pozor:

Nepoužívejte automatizovanou interpretaci bez zohlednění níže popsaných pokynů k interpretaci.

9.1 Validace – kontrola kvality

Vyhodnocení testu lze provést, pokud jsou splněna následující kritéria:

1. Kontrolní pás reakce (čára úplně nahoře) je výrazně zbarvený, tmavý pás.
2. Třída protilátek (druhý pás): kontrolní pás konjugátu IgG, resp. IgM musí ukazovat výrazné zbarvení.
3. Cut-off kontrola (třetí pás): slabé, ale viditelné zbarvení

9.2 Vyhodnocení

Vyhodnocení testovacích proužků může být vizuální nebo pomocí počítače s využitím programu na vyhodnocování testovacích proužků recomScan. Software recomScan je určený na podporu interpretace testovacích proužků. Další informace a příslušné návody k počítačem podporovanému vyhodnocení Vám poskytne MIKROGEN na požádání. Následující návod se vztahuje na vizuální vyhodnocení.

9.2.1 Hodnocení intenzity pásů

- Do přiloženého hodnoticího archu запиšte datum a číslo šarže a detekovanou třídu protilátek.
- Zapište do hodnoticího archu identifikační čísla vzorků.
- Nyní lepicí tyčinkou nalepte příslušné testovací proužky do odpovídajících políček hodnoticího archu. Testovací proužky s kontrolním pásem reakce pro tyto účely zarovnejte se zakreslenou značkovací čarou. Testovací proužky pak nalepte průhlednou lepicí páskou vlevo od značkovací čáry (nepřelepte kontrolní pás reakce!). Plošné nalepení celých testovacích proužků lepicí tyčinkou nebo lepicí páskou může vést ke změnám zabarvení.
- Nyní pásy rozvinutých testovacích proužků identifikujte na základě natištěného kontrolního proužku na hodnoticím archu a запиšte je do hodnoticího archu. Proveďte na základě Tabulka 1 hodnocení intenzity vzniklých pásů odděleně pro příslušné třídy imunoglobulinů.

Tabulka 1 : Hodnocení intenzity pásů ve vztahu k cut-off pásu

Intenzita zbarvení pásů	Hodnocení
Žádná reakce	-
Velmi slabá intenzita (nižší než cut-off pás)	+/-
Slabá intenzita (odpovídá cut-off pásu)	+
Silná intenzita (vyšší než cut-off pás)	++
Velmi silná intenzita	+++

9.3 Interpretace výsledků testu

Kritéria pro interpretaci testů jsou uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2: Interpretace testu

Výsledek testu	Kritéria
Negativní	žádný antigen \geq cut-off hodnota
Sporný	kterýkoli z antigenů \geq cut-off hodnota
Pozitivní	minimálně dva z antigenů, kterékoli \geq cut-off hodnota

10 Meze metody, omezení

- Na sérologické výsledky testu je nutné vždy nahlížet v souvislosti s dalšími lékařskými vyšetřeními pacienta. Terapeutické důsledky sérologického nálezu je nutné vyvodit v souvislosti s klinickými daty.
- Pro správnou interpretaci výsledků testu je důležité zvážit možné křížové reakce. Rod *Treponema* patří stejně jako rod *Borrelia* do čeledi *Spirochaetaceae*. V literatuře byly popsány křížově reagující protilátky proti dílčím antigenům, které jsou společné pro čeleď *Spirochaetaceae* (4). Křížově reagující protilátky proti antigenům Tp47, TmpA, Tp257 (Gpd), Tp453, Tp17 a Tp15, které se používají v testu recomLine Treponema, nebyly popsány. Jedná se o charakteristické antigeny *Treponema pallidum*, které nevykazují žádnou reaktivitu v séru pozitivním na *borrelie*.
- Ani negativním výsledkem testu recomLine Treponema nelze infekci *Treponema pallidum* vyloučit. V případě přetrvávajícího klinického podezření na infekci *Treponema pallidum* a negativních sérologických nálezů by měl být po čtyřech týdnech proveden další odběr vzorků a další test.
- Pozitivní výsledek IgG nebo IgM ještě nemusí v každém případě znamenat aktivní onemocnění.
- Tmavé testovací proužky:** Některé vzorky pacientů mohou na kompletním nitrocelulózovém proužku vytvářet tmavé, průběžné nebo vzorované zabarvení. Mohou za to různé faktory z příslušného séra pacienta. Vyhodnocení těchto proužků je zpravidla možné jen s omezením. Například „inverzní“ pásy (bílé pásy na tmavém pozadí) je tak nutné hodnotit jako negativní. Příslušné sérum by pak mělo být každopádně přezkoumáno jinými sérologickými metodami.

11 Výkonové charakteristiky

11.1 Diagnostická citlivost

recomLine Treponema	Pozitivní předběžné nálezy ve dvou referenčních testech			
	Zpracování 1 hod.		Zpracování 3 hod.	
	IgG (n = 280)	IgM (n = 90)	IgG (n = 39)	IgM (n = 38)
Negativní	0	0	0	0
Sporný	2	7	1	0
Pozitivní	278	83	38	38
Citlivost	100 %*	100 %*	100 %*	100 %

* Včetně sporných výsledků.

11.2 Diagnostická specifita

recomLine Treponema	Dárci krve			
	Zpracování 1 hod.		Zpracování 3 hod.	
	IgG (n = 200)	IgM (n = 199)	IgG (n = 40)	IgM (n = 40)
Negativní	199	196	40	38
Sporný	1	3	0	2
Pozitivní	0	0	0	0
Specifita	99,5 %	98,5 %	100 %	95 %

11.3 Analytická specifita

Analytická specifita je definována jako schopnost testu přesně stanovit analyt v přítomnosti potenciálních interferenčních faktorů v matici vzorku nebo křížových reakcí s potenciálně interferujícími protilátkami.

a) **Interference:** Kontrolní studie k potenciálním interferujícími faktorům ukázaly, že výkon testu není ovlivněn antikoagulanty (CPD, citrát sodný, EDTA, heparin), hemolýzou (do 1 000 mg/dl hemoglobinu), lipémií, bilirubinemií (do 20 mg/dl bilirubinu) ani cykly hlubokého mražení a rozmrazování vzorku.

b) **Křížové reakce:** V kontrolních studiích byly zkoumány potenciální interference protilátek proti jiným organismům (např. *Borrelia burgdorferi*, HCV nebo HIV). Dále byly testovány stavy, při nichž dochází k atypické aktivitě imunitního systému (např. antinukleární autoprotilátky, těhotenství nebo infekce herpes viry, např. EBV*). Nebyly prokázány žádné křížové reakce.

* Při akutní infekci IBV může docházet k nespecifické IgM reaktivitě v testu recomLine Treponema IgM (např. polyklonální stimulace).

12 Literatura

- Hagedorn HJ Treponemen. Laboratoriums Medizin, Diagnostische Bibliothek 1997, 49, 1-8
- Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin. Microbiol. Rev. 1995, 8(1), 1-21
- Norris SJ and the Treponema Pallidum Polypeptide Research Group Polypeptides of Treponema pallidum: Progress toward Understanding Their Structural, Functional, and Immunologic Roles. Microbiol. Rev. 1993, 57(3), 750-79
- Alfen I, Wellensiek HJ Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. Lab. Med. 1994, 18, 12-19
- Sambri V., et al, Western Immunoblotting with Five Treponema pallidum Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001 (8), Nr. 3: 534-539
- Van Voorhis W. C., et al, Serodiagnosis of Syphilis: Antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by Treponema pallidum, Journal of Clinical Microbiology, Aug. 2003, 41/8, 3668-3674
- Robert Koch Institut, Syphilis in Deutschland im Jahr 2006 und Trends seit 2001, Epidemiologisches Bulletin, Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health; 20. Juli 2007 / Nr. 29

Na požádání vám rádi zašleme další literaturu k diagnostice Treponema.

13 Vysvětlení symbolů

	Obsah stačí na přípravu <n> roztoků Počet roztoků
EVALFORM	Hodnoticí arch
INSTRU	Návod k použití
	Čtete návod k použití
CONT	Obsah, obsahuje
IVD	In vitro test
LOT	Číslo šarže/verze
	Nezmrazujte
REF	Objednací číslo
	Spotřebujte do Datum spotřeby
	Uchovávejte při teplotě x-y °C
	Výrobce

14 Údaje o výrobci a verzi

recomLine Treponema IgG recomLine Treponema IgM	Kat. č. 5172 (5170) Kat. č. 5173 (5179)
Návod k použití platí od	GARLTP004CS 2023-03
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Německo Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Web www.mikrogen.de



GARLTP004