

MASTAFLUOR™ FTA-ABS

Imunofluorescenční test na detekci IgG protilátek proti *Treponemě pallidum* v lidském séru, plasmě a CSF

Návod k použití



Pouze pro *in vitro* diagnostiku

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgG

REF 630522

10 x 10 testů

Výrobce:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriums-Präparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 (0) 4533 2007-0
Fax: +49 (0) 4533 2007-68
Web: www.mast-diagnostica.de
E-Mail: mast@mast-diagnostica.de

Distributor:

Gali spol. s r.o.
Ke Stadionu 179
513 01, Semily
Česká republika
Tel.: 481 689 050
Fax: 481 689 051
E-Mail: Info@gali.cz

MASTAFLUOR™ FTA-ABS – 2005-09-12

Úvod

Syfilis je vysoce infekční sexuálně přenosné onemocnění způsobené spirochetou *Treponema pallidum*. Po infestaci se na genitáliích v místě vstupu infekčního agens vytvářejí primární léze nebo vředy. Onemocnění má od počátku systémový charakter a pokud není léčeno, může se vyvíjet po desetiletí.

Patogenní treponemy zahrnují *T. pallidum*, původce syfilis, *T. pertenue*, původce frambezie a *T. carateum*, původce onemocnění pinta. V Evropě se nejčastěji vyskytuje *T. pallidum*. Navíc existuje celá řada komenzálních druhů treponem a je důležité je odlišit od *T. pallidum* předtím, než je určena diagnóza primárního syfilis.

Komenzální treponemy mohou být kultivovány na umělých médiích, zatímco pokusy o kultivaci patogenních treponem *in vitro* selhaly.

Klinická diagnostika syfilis je založena jednak na laboratorním průkazu přítomnosti antigenu *T. pallidum* v exudátech z lézí, a také na průkazu přítomnosti protilátek proti tomuto agens v séru pacienta. Metody používané ke sledování protilátkové odpovědi na treponemovou infekci mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin:

1. Testy pro detekci protilátek proti nespecifickým treponemovým antigenům např. kardiolipinové či lipidální antigeny. Tyto testy se formálně nazývají „Reaginové“.
2. Testy pro detekci protilátek proti antigenům specifickým k patogenním treponemám např. *T. pallidum* částicový aglutinační test (TPPA) a imunofluorescenční test na detekci protilátek proti *T. pallidum* (FTA-ABS).

Test FTA-ABS je vysoce specifický a senzitivní v všech stádiích infekce syfilis a je považován za referenční metodu. Tento test je navíc velmi často používán jako konfirmační pro diagnostiku syfilis.

Popis

Souprava MASTAFLUOR™ FTA-ABS stejně tak, jako samostatné slidy představují testovací systém založený na principu nepřímé imunofluorescence pro detekci specifických protilátek proti *T. pallidum*. Souprava se používá ke konfirmaci a diferenciální diagnostice syfilis.

FITC-značené anti-IgM protilátky (Ref. 626292 nebo 626285) a MASTSORB (Ref. 651003), pro absorpci revmatoidních faktorů, mohou být objednány samostatně.

Princip testu

Sérum pacienta nebo vzorek likvoru musí být nejdříve předupraven sorbentem, který se nazývá Reiterův roztok. Jedná se o přípravek obsahující skupinově specifické treponemové antigeny patogenních a komenzálních treponem. Tato předúprava zajistí absorpci ve vzorku potenciálně přítomných nespecifických „reaginových“ protilátek.

Absorbované sérum pacienta nebo vzorky likvoru a odpovídající upravené kontroly jsou aplikovány a inkubovány v jamkách sklíček, které jsou kautovány fixovanými buňkami *T. pallidum*. Pokud jsou ve vzorku přítomny specifické protilátky, dojde k jejich navázání na fixované buňky za vytvoření stabilního

komplexu antigen-protilátka. Následně jsou sklíčka promyta z důvodu odstranění nenavázaných součástí a navázané protilátky jsou detekovány přidáním fluorescenčně značeného anti-lidského imunoglobulinového konjugátu. Po dalším promytí, které zabezpečí odstranění nenavázaného konjugátu, jsou sklíčka vyhodnocována pod fluorescenčním mikroskopem.

Pozitivní reakce je pozorována jako sytě zelená fluorescence organismu *T. pallidum*.

Podrobnosti o balení a objednávání

MASTAFLUOR™ FTA-ABS je dodáván jako kompletní souprava pro provedení 100 testů (10 x 10 jamek). Je možné objednat i samostatná balení sklíček.

Součásti soupravy

Položky 1 – 8 jsou dodávány jako součásti soupravy. V balení sklíček jsou dodávány pouze položky 1 a 8.

1. Sklíčka

Deset sklíček o 10 jamkách, každá jamka je kautována fixovanými buňkami *T. pallidum* (Nichols strain). Každé sklíčko je zabaleno v hliníkovém obalu společně se silikagelem.

2. Reaktivní kontrolní sérum

Jedna lahvička obsahující 1 mL lidského séra s obsahem specifických protilátek (IgG) proti *T. pallidum*. Obsahuje < 0,1% azidu sodného jako konzervantu.

3. Nespecifické kontrolní sérum

Jedna lahvička obsahující 1 mL lidského séra s obsahem nespecifických protilátek proti treponemám. Obsahuje < 0,1% azidu sodného jako konzervantu.

4. FITC – Konjugát

Jedna lahvička obsahující 3 mL anti-lidského imunoglobulinu (γ řetězec, králičí) konjugovaného s fluorescein isothiokyanátem (FITC). Připraven k použití. Obsahuje proclin jako konzervant.

5. PBS prášek

Dva sáčky PBS prášku – každý k rozpuštění v 1 litru destilované vody k přípravě fyziologického roztoku (fosfátového pufru PBS) o pH 7.2 ± 0.2. Použití jako promývací roztok a sérum diluent.

6. Montovací médium

Jedna lahvička obsahující 3 mL pufrovaného glycerolového montovacího média. Obsahuje proclin jako konzervant. Připraveno k použití.

7. FTA Sorbent

Dvě lahvičky, každá s obsahem 5 mL extraktu kultury *Treponema reiteri*. Obsahuje proclin jako konzervant. Připraven k použití.

8. Návod k použití

Prosím, čtěte pozorně před prováděním testu.

Potřebný materiál, který není součástí soupravy

1. Sterilní zkumavky
2. Mikropipety a špičky na jedno použití
3. Plastová miska pro inkubaci sklíček, barvicí kvjeta
4. Vlhká komůrka
5. Odměrná baňka pro PBS
6. Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality
7. Pinzeta
8. Transmitanční nebo epi-fluorescenční mikroskop se 490 nm excitačním filtrem a s 510 nm filtrem
9. Krycí sklíčka
10. Plastová stříčka na promývání

Uchovávání s trvanlivost reagentů

Souprava MASTAFLUOR™ FTA-ABS může být použita do doby expirace, která je uvedena na obale.

Všechny součásti soupravy a reagentie musí být skladovány při teplotě 2 – 8 °C a před použitím musí být vytemperovány na pokojovou teplotu.

Rekonstituovaný PBS prášek by měl být skladován při teplotě 2 – 8 °C po dobu nejdéle 30 dnů.

Vzorky séra a likvoru by měly být před použitím skladovány při teplotě 2 – 8 °C nebo po delší dobu při - 20 °C. Rozmražené vzorky znovu nezmrazujte.

Upozornění a zvláštní opatření

1. Pouze pro *in vitro* diagnostiku.
2. Před prováděním testu čtěte pozorně návod k použití. Neměňte pracovní postup.
3. Soupravu nepoužívejte po uplynutí doby expirace.
4. Při práci používejte odpovídající ochranné pracovní pomůcky.
5. Pipety nevkládejte do úst.
6. Využívejte co nejčastěji plastové pomůcky na jedno použití. Skleněné pomůcky pro více použití vždy důkladně omyjte a před použitím je důkladně opláchněte vodou bez přídavku detergentů.
7. Kontrolní séra dodávaná v soupravě byla shledána negativníma na HBsAg a na přítomnost protilátek proti HIV. Nicméně, je třeba s tímto materiálem zacházet jako s potenciálně infekčním, schopným přenosu infekce. Neexistuje stoprocentní jistota, že séra neobsahují žádnou infekci či jinou mikrobiální kontaminaci.
8. Používejte destilovanou vodu nebo vodu vyšší kvality.
9. Nezaměňujte reagentie mezi různými šaržemi, protože reagentie jsou kalibrovány v každé šarži zvlášť.
10. Křížově nekontaminujte reagentie nebo nezaměňte uzávěry na lahvičkách. Vždy používejte čisté pipety a nové špičky zvlášť pro každý vzorek a reagentii.
11. Během provádění testu vždy zabraňte vyschnutí jamek.
12. Při inkubaci nevystavujte sklíčka intenzivnímu slunečnímu záření ani jiným podobným nežádoucím vlivům.
13. Kontaminované plastové pomůcky musí být rychle likvidovány a spáleny. Kontaminované skleněné pomůcky mohou být buď autoklávovány při teplotě 121 °C po dobu 1 hodiny nebo dekontaminovány 2.5 % roztokem

chlornanu sodného. Veškerý tekutý odpad by měl být adekvátně dekontaminován např. za využití chlornanu sodného.

14. Nevystavujte FITC-Konjugát přímému slunečnímu záření, UV světlu či světlu ze zářivek. FITC-Konjugát uchovávejte co nejvíce ve tmě.
15. Mikrobiálně kontaminované vzorky séra by neměly být používány.
16. V případě, že je nutné použít hemolytické či lipemické vzorky sér, je nutné je před použitím tepelně inaktivovat při 56 °C.
17. Jak bylo dříve uvedeno, jako konzervant je použit azid sodný. Při požití může být toxický. Azid sodný může reagovat s olovem či se sloučeninami mědi za vzniku vysoce explozivních solí. Vždy odstraňujte do výlevky naředěný velkým množstvím vody.

Pracovní postup

1. Fakultativně: Všechny vzorky a kontroly inaktivujte zahřátím na teplotu 56 °C po dobu 30 min.
2. Před použitím nechte veškerý materiál vytemperovat na pokojovou teplotu (min. 20 °C).
3. Rozpusťte obsah jednoho sáčku PBS prášku v 1 litru destilované vody nebo vody vyšší kvality.
4. Naředte všechny vzorky sér v poměru 1:5 sorbentem, např. 10 µL séra + 40 µL sorbentu. Všechny vzorky likvoru naředte v poměru 1:3 sorbentem, např. 20 µL likvoru + 40 µL sorbentu.
5. Naředte kontrolní séra v poměru 1:5 sorbentem nebo PBS (10 µL séra + 40 µL sorbentu nebo PBS) viz níže:
 - a. Reaktivní kontrolní sérum + sorbent
 - b. Reaktivní kontrolní sérum + PBS
 - c. Nespecifické kontrolní sérum + sorbent
 - d. Nespecifické kontrolní sérum + PBS
6. Inkubujte všechny vzorky při 37 °C po dobu 30 minut.
7. Opatrně vyjměte požadovaný počet sklíček z jejich obalu a důkladně je popište. Sklíčka držte pouze na jejich rohu a nedotýkejte se jamek. Sklíčka umístěte do vlhké komůrky.
8. Aplikujte 20 – 25 µL vzorku a kontrol do příslušných jamek na sklíčku podle připraveného pracovního postupu. Navíc, pokud je třeba, aplikujte do 2 zbylých jamek 20 – 25 µL PBS (do jedné) a 20 – 25 µL sorbentu (do druhé). Toto bude sloužit jako kontrola reagentů a tyto jamky budou inkubovány v následujících krocích stejně jako jamky obsahující vzorky nebo kontroly. Ujistěte se, že všechny jamky jsou zaplněny a že v nich není přebytek vzorku, který by mohl z jamek přetékat. Vyhněte se přímému kontaktu špičky pipety s povrchem sklíčka z důvodu možného poškození kautovaného antigenu.
9. Přiklopte vlhkou komůrku a inkubujte při 37 °C po dobu 30 minut.
10. Po inkubaci opatrně promyjte sklíčka pomocí plastové stříčky s roztokem PBS. Jamky nesmí být promývány přímým proudem roztoku ze stříčky. Opatrné promytí může být provedeno tak, že se přímý proud roztoku PBS ze

stříčky namíří na střed sklíčka, které se nejdříve naklopí na stranu směrem k jamkám č. 1 – 5 , a poté se sklíčko naklopí na druhou stranu směrem k jamkám č. 6 – 10.

11. Sklíčka se promývají ponořením do květy obsahující roztok PBS po dobu 15 minut. Každých 5 minut vyměňte roztok PBS.
12. Vyjměte sklíčka jedno po druhém z květy a vysušte přebytek PBS. Za využití pijáku vysušte prostor okolo jamek. Otřete veškerý přebytek PBS i z druhé strany sklíček. Nedotýkejte se povrchu jamek.
13. Ihned umístěte sklíčko do vlhké komůrky a přidejte 20 – 25 µL FITC-Konjugátu do každé jamky. Opakujte kroky 12 a 13 pro všechna zbývající sklíčka. Nenechejte jamky vyschnout.
14. Inkubujte sklíčka při 37°C ve vlhké komůrce a ve tmě po dobu 30 minut.
15. 15 minut před použitím zapněte mikroskop.
16. Po inkubaci promyjte sklíčka roztokem PBS jako v krocích 10 a 11.
17. Po promytí vyjměte sklíčka z PBS a vysušte je tak, jako v kroku 12.
18. Aplikujte jednu malou kapku montovacího média do každé jamky. Umístěte krycí sklíčko a ihned odečítejte výsledky. Zabraňte vzniku vzduchových bublin pod krycím sklíčkem. Přebytek montovacího média na sklíčku může způsobit zvýšení fluorescenčního pozadí díky rozptylu světla. Odstraňte přebytek montovacího média např. papírovým ubrouskem. Vyhněte se přímému pohybu krycího sklíčka.
19. Hodnoťte pod fluorescenčním mikroskopem při celkovém zvětšení 400x – 500x.

Interpretace výsledků

1. Validita testu

Před vyhodnocováním vzorků pacientů vyhodnoťte nejprve kontrolní vzorky. Aby byl test validní, kontroly musí poskytovat následující hodnoty. Pokud kontroly neposkytnou uvedené hodnoty, pak se test považuje za nevalidní, vzorky pacientů se nehodnotí a test se musí zopakovat.

VZOREK	OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY
Reaktivní kontrolní sérum + Sorbent	1+ - 3+
Reaktivní kontrolní sérum + PBS	3+ - 4+
Nespecifické kontrolní sérum + Sorbent	Negativní
Nespecifické kontrolní sérum + PBS	2+ - 4+
PBS Reagenční kontrola	Negativní
Sorbent Reagenční kontrola	Negativní*

Negativní*: Treponemy mohou být viditelné, ale nefluoreskují

Interpretace výsledků u vzorků pacientů

Vzorky sér jsou vyhodnocovány cestou porovnávání s kontrolami, které jsou součástí testu.

Pozitivní vzorky:

Vzorky jsou považovány za pozitivní, pokud se intenzita fluorescence pohybuje v rozmezí od 1+ do 4+ (kde hodnota >1+ je považována za pozitivní a <1+ za negativní). Hodnota 1+ je považována za minimálně reaktivní.

Pokud je stanovena intenzita fluorescence odpovídající hodnotě 1+, měla by být pozitivní kontrola, dodávaná jako součást soupravy, naředěna v titru, který je uveden v QC certifikátu.

Hraniční vzorky:

Vykazují velmi nízkou, nicméně patrnou fluorescenci (+/-). U těchto vzorků test opakujte.

Negativní vzorky:

Většina jamek s negativními vzorky nefluoreskuje a žádné treponemy nejsou viditelné. V některých případech je možné pozorovat nehomogenní struktury: fluorescence se vyskytuje jen u některých treponem či jejich částí, ale ostatní treponemy ve stejné jamce fluorescenci nevykazují. Takové jamky mohou být hodnoceny jako negativní.
















Omezení

1. FTA-ABS test může občas za určitých okolností poskytovat falešně pozitivní výsledky. Jedná se například o tyto stavy a onemocnění: těhotenství⁴, lepra⁵ a systémový lupus erythematosus⁶.
2. FTA-ABS test je charakteristický vysokou senzitivitou a specificitou, nicméně výsledky by měly být interpretovány v souladu s výsledky dalších sérologických testů, klinickým stavem pacienta a jeho diagnosticky významným návykům a chování.

Literatura

1. Robertson DHH, McMillan A, Young H. Syphilis: introduction In: *Clinical Practice in sexually transmissible disease*, 1988. Pub. Churchill Livingstone.
2. Young H. Treponema: serological tests for syphilis In: Mackie and McCartney *Practical Medical Microbiology* 13th Edition, 1988, Pub. Churchill Livingstone.
3. Hunter EF, Deacon WE, Meyer PE. An improved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS). *Pub Hlth Repts.* 1964, 79: 410-214
4. Buchanan CS, Hasenck JR. FTA-ABS test in pregnancy. A probable false positive reaction. *Arch Dem.* 1970: 102: 322-325.
5. Scotti AT, Mackey DM, Trautman JR. Syphilis and biologic false positive reactions among leprosy patients. *Arch Dem.* 1970, 101:328-330
6. Sepetjian M, monier JC, Thivolet J. et al. False positive cardiolipid and FTA serological tests in patients with antinuclear antibodies. *Path Biol.* 1976, 24: 397-400

Vysvětlivky ke zkratkám a ikonám použitým na štítcích

	Skříčka
	Pozitivní kontrola
	Negativní kontrola
	FITC-Konjugát
	PBS Promývací pufr
	Evans Modrá
	Montovací médium
	Šarže
	Katalogové číslo
	Anti-lidský globulin
	Připraven k použití
	Návod k použití
	Důležité poznámky
	Datum expirace
	Skladování