



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE
„CANTACUZINO”
Splaiul Independenței 103, București, 050096

LABORATORUL NAȚIONAL DE REFERINȚA PENTRU ITS

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Sef laborator	Sef laborator	Director LNR
Nume prenume	Dr. Dan Ionescu		
Semnatura*			
Data			

* Semnatura se aplică pe documentul original

INSTRUCȚIUNE DE LUCRU

DETECTAREA ANTICORPILOR ANTI-TREPONEMICI DIN CLASA IgM PRIN ELISA - SYPHILIS M CAPTURE

Cod:

Editia :

Revizia :

Data aplicării :

Avertisment

*Documentul de față este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »
Reproducerea și difuzarea documentului sunt în exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»
Copiile sunt numerotate și controlate.*

Exemplar nr : _____

Destinatarul: _____

Exemplar : controlat necontrolat

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FISA DE LUCRU DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI DIN CLASA IgM PRIN ELISA – SYPHILIS M CAPTURE Cod :
---	--

1. SCOP

Documentul descrie operațiunile necesare executării testului ELISA cu trusa **PATHOZYME – SYPHILIS M CAPTURE**, pentru confirmarea serologică a infecției active cu *Treponema pallidum* (probe ser / plasma adulți) sau a sifilisului congenital (probe ser / plasma nou-născuți).

2. MOD DE LUCRU

2.1. Resurse necesare

2.1.1. Materiale/reactivi din trusă

- placă microtitrare cu capac (șiruri de godeuri detașabile) sensibilizată cu anticorpi anti-lanturi μ pentru captura IgM
- diluent pentru probe, gata de lucru, portocaliu, **R1**
- control negativ, gata de lucru, albastru, **R2**
- control slab pozitiv, gata de lucru, verde, **R3**
- control intens pozitiv, gata de lucru, roșu, **R4**
- soluție de spălare 20x, **R5**
- diluent pt. conjugat, gata de lucru, mov, **R6A**
- conjugat *T. pallidum* 100x, incolor, **R6B**
- antigen de control, 100x, incolor, **R6C**
- substrat TMB, gata de lucru, incolor, **R7**
- soluție de stopare, gata de lucru, incolor, **R8**

Componentele trusei se păstrează la $+2+8^{\circ}\text{C}$, se feresc de expunere prelungită la lumină. Se folosesc numai până la data de expirare. După scoaterea godeurilor necesare, restul stripurilor, reintroduse în plicul original, care se închide ermetic, se depozitează imediat la $+2+8^{\circ}\text{C}$.

2.1.2. Materiale suplimentare

- apă purificată pentru diluarea soluției de spălare
- sticlărie de laborator curată
- cameră umedă (cutie Petri diam. 20 cm, captusită cu hârtie de filtru umezită)
- conuri de prelevare
- hârtie de filtru
- vas cu dezinfectant (ACTISEPT 1 tb. 2,5g/ 10L apă sau hipoclorit 1.5-2%)
- manuși latex

2.1.3. Dispozitive/echipamente

- micropipete: 10 μL - 200 μL , 1000 μL ,
- dispenser multicanal 50 - 250 μL
- termostat $+ 37^{\circ}\text{C}$
- Spectrofotometru, - program citire cu filtru 450 nm

2.2. Precauții necesare pentru lucru

Trusa conține reactivi de origine umană care vor fi considerați cu potențial patogen

Prezervativii folosiți sunt toxici dacă se ingeră.

Soluția de stopare este corozivă, se manipulează cu grijă; în caz de accident se clătește cu multă apă

Nu se lucrează cu reactivi din truse diferite

Când se lucrează nu se atinge interiorul godeurilor cu varful pipetei, sau exteriorul cu degetele.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO	FISA DE LUCRU DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI DIN CLASA IgM PRIN ELISA – SYPHILIS M CAPTURE Cod :
LNR ITS	

Înainte de folosire flacoanele cu reactivi se agită cu grijă evitându-se formarea de spumă. Capacele flacoanelor cu reactivi se pun la loc imediat după folosire și nu se încurcă. După începerea procedurii, godeurile nu trebuie să se usuce între etapele de lucru. Pentru fiecare probă / reactiv se folosește un singur vârf pentru a se evita contaminarea încrucișată. Substratul TMB se folosește atâta vreme cât este incolor.

2.3. Pregătirea probelor și reactivilor pentru lucru

2.3.1. Pregătirea probelor pentru testare

- Probele se diluează 1/100 (10 μ L proba + 90 μ L diluent pentru proba R1); după diluare se folosesc maximum 8h. Se folosesc numai probe proaspete sau înghețate/dezghețate o singura data.

2.3.2. Pregătirea reactivilor pt. lucru

- Soluția de spălare 20x (R5): se diluează 1:19 cu apa purificată. Pentru un șir de 8 godeuri, spălate manual se pregătesc 40mL soluție de spălare : 2mL 20x + 38mL apa purificată. Pentru spălarea automată se pregătește o cantitate dublă de soluție. Soluția de spălare se folosește numai în ziua preparării.
- Conjugatul (R6A , R6B, R6C) : pentru fiecare șir de 8 godeuri se pregătește 1mL de conjugat diluat : 1000 μ L diluent R6A + 10 μ L *T.p.*conjugat HRP R6B + 10 μ L antigen de control R6C.

2.4. Executarea testului

Etapele de lucru se înregistrează în Fișa de lucru Cod : , la care se anexează Fișa de înregistrare automată a fotometrului.

- Se verifică temperatura camerei de lucru (+20+25°C) și se notează în Fișa de lucru
- Se scot reactivii și probele din frigider și se lasă în repaus la temperatura de lucru 30min.
- Se completează grila de lucru în Fișa, care include , în afară de probele de testat, controalele din trusă. R2 și R3 se lucrează **obligatoriu în duplicat**.
- Se diluează serurile de testat cu diluentul de probă **R1** cf. pct. 2.3.1. (martorii din trusă nu se diluează)
- Se repartizează probele, inclusiv martorii câte 100 μ L / godeu, conform grilei. Martorii (**R2-4**) se repartizează ultimii. Se agită ușor placa, 5 secunde, se acoperă cu capacul și se incubează în camera umedă 1h la 37°C.
- În timpul incubării se pregătește conjugatul cf.2.3.2. (1mL pt. 8 godeuri) din reactivii **R6A,R6B,R6C**
- Spălare manuală : se spală godeurile de 5x cu câte 250 μ L/godeu. Conținutul godeurilor se golește în vasul cu dezinfectant; după spălări se înlătură excesul de tampon prin scuturare pe hârtie de filtru.
- Spălare automată : se urmaresc instrucțiunile de utilizare ale spălătorului automat.
- Se repartizează câte 100 μ L conjugat / godeu , se agită ușor 5 sec., se acoperă cu capacul și se reintroduce placa în camera umedă ,care a rămas în termostat. Se incubează 1h la +37°C.
- La sfârșitul incubării se repetă procedura de spălare (250 μ L soluție de spălare/ godeu de 5 ori)
- Se repartizează câte 100 μ L substrat TMB (**R7**) , /godeu se agită ușor 5 sec. înainte de a acoperi placa cu capacul. Reacția de culoare are loc la întuneric, 20-30°C, timp de 30min.
- Stoparea reacției cu 100 μ L /godeu soluție de stopare (**R8**). În godeurile ,care conțin enzima , culoarea albastră virează spre galben.
- Citirea rezultatelor : se face blank-ul pe aer și măsurarea absorbanței la 450 nm imediat după adăugarea soluției de stopare. Rezultatele ,înregistrate la imprimanta fotometrului se atasează Fișei de lucru.

2.5. Validarea testării

- Media controalelor negative **R2** B1+C1 trebuie să fie < 0,200.
- Media controalelor slab pozitive **R3** D1+E1 trebuie să fie cuprinsă între 0.200 – 0,800
- Controlul pozitiv **R4** F1 trebuie să fie > 0,800

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FISA DE LUCRU DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI DIN CLASA IgM PRIN ELISA – SYPHILIS M CAPTURE Cod :
--	--

2.6. Calcularea și interpretarea rezultatelor.

Nivelul CO = media val. DO martor slab pozitiv **R3**

Rezultat negativ = rezultat mai mic decât CO – 10%

Rezultat pozitiv = rezultat mai mare decât CO + 10%

Rezultat indeterminat = situat in zona gri CO ± 10%

Pentru compararea rezultatelor între testări succesive la un același pacient, se calculează indexul de anticorpi (IA) :

$$IA = DO \text{ probă} / CO$$

3. CRITERII DE ACCEPTARE / RESPINGERE

Rezultatele testului sunt acceptate numai dacă s-au îndeplinit condițiile de validare , în caz contrar testarea se repetă

In cazul unui rezultat indeterminat, se repeta testarea pe o proba noua dupa 3 – 4 saptamani.

4. FORMULARE, ÎNREGISTRĂRI

4.1. Fișa de lucru trusa ELISA - SYPHILIS M CAPTURE Cod :

4.2. Fisa inregistrare rezultate Cod:

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FISA DE LUCRU DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI DIN CLASA IgM PRIN ELISA – SYPHILIS M CAPTURE Cod :
---	--

ANEXA 1

FISA NR.: _____ DATA TESTARII _____

Termometru ID:	Temperatura camerei	Valori specificate: + 20+25°C	Valoare constatata:
----------------	---------------------	-------------------------------	---------------------

Pipeta ID:	Incubator ID:	Spalator ID:	Cititor ID:
------------	---------------	--------------	-------------

Lot trusa:	Data expirarii:	Tip proba:
------------	-----------------	------------

GRILA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Validare test:

Blank A1 DO = <input type="checkbox"/>	CN C1 DO = <input type="checkbox"/>	CP low E1 DO = <input type="checkbox"/>	CO _{mediu} = DO (D1+E1) / 2 = <input type="checkbox"/>
CN B1 DO = <input type="checkbox"/>	CP low D1 DO = <input type="checkbox"/>	CP high F1 DO = <input type="checkbox"/>	

DO (B1+C1) / 2 < 0.200	CO _{mediu} = DO intre 0.200- 0.800	DO F1 > 0.800
Proba pozitiva DO > CO _{mediu} +10%	Proba negativa DO < CO _{mediu} -10%	Zona gri DO CO _{mediu} ±10%

Se ataseaza rezultatele tiparite de imprimanta cititorului liniei ELISA exprimate in DO.

Observatii:

Se repeta testul DA NU

Operator:

Responsabil analiza:

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FISA DE LUCRU DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI DIN CLASA IgM PRIN ELISA – SYPHILIS M CAPTURE Cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

ANEXA 2

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FIȘĂ ÎNREGISTRARE REZULTATE Nr.....din data de :..... TEST TRUSA PATOZYME SYPHILIS M CAPTURE cod :
---	--

Lot trusă : Data expirării : **Validare test** → media OD CO > 0.2 DA [] NU []

	1			2			3			4			5			6		
	Probă	OD	IA	Probă	OD	IA	Probă	OD	IA	Probă	OD	IA	Probă	OD	IA	Probă	OD	IA
A	blank																	
B	R2																	
C	R3 CO																	
D	R3 CO																	
E	R4 M+																	
F																		
G																		
H																		

Nivel cut off = media OD CO =

Calcul interval cut off = val.medie CO ± 10% =

Intrepretare :

Rezultat la limita valori egale sau intre cut off ± 10%
 Rezultat negativ = OD proba mai mic decat rezultat la limita
 Rezultat pozitiv = mai mare decat rezultat la limita
 Calcul Index Anticorpi (IA) = OD proba / cut off

Operator :

Verificat :