PATHOZYME® SYPHILIS COMPETITION Ref OD117/OD157

Inmunoensayo de enzima (EIA) para la detección del total de anticuerpos al *Treponema palladium* en suero humano

Almacenar a 2°C hasta 8°C NO CONGELE

Para uso in-vitro únicamente

INTRODUCCION

El PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION es un inmunoensayo competitivo (EIA) para la detección del total de anticuerpos al *Treponema pallidum* en suero humano.
La *T pallidum* es una bacteria espiroqueta que causa la enfermedad de transmisión sexual sífilis. A pesar de su importancia mundial como un agente infeccioso y el debilitamiento crónico que se sufre causado por la enfermedad, se dispone de una información limitada sobre el *T. pallidum*. El organismo no puede ser cultivado continuamente in Vitro, no se dispone de vacuna y los mecanismos de patogénesis no son totalmente claros. (1.2)
La infección por el T *pallidum* es sistemática y complicada por periodos de latencia en las etapas tardías de la enfermedad. Sin embargo la sífilis puede ser curada de manera relativamente sencilla. Y en las etapas tardías de la enfermedad y el tratamiento pueden limitar cualquier daño permanente causado por esta bacteria. (1),
La sífilis también puede ser contraída congénitamente. Si el feto se contagia tempranamente durante el embarazo, generalmente ocurre un aborto espontáneo. Esto puede ser detenido diagnosticando y tratando la sífilis.
Todas las características expuestas de esta enfermedad subraya la importancia de las técnicas serológicas en el diagnóstico de la sífilis.. El kit **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** es bastante sensible y específico para la investigación primaria de los anticuerpos a *T. pallidum* como una ayuda para la detección de la enfermedad.

USO PRETENDIDO

El kit **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** es una prueba in Vitro de diagnóstico para la detección de la sífilis.
La prueba detecta primordialmente el IgG y el IgM por consigueine tiene una alta sensibilidad en todas las etapas de la enfermedad (3). Ya que esta prueba no requiere dilución del suero o de preparación del reactivo y solo tiene una etapa de lavado, está idealmente apropiado para la automatización para probar grandes números de muestras.
Para uso profesional únicamente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El antígeno purificado derivado del Treponema *pallidum* es unido a la superficie de los pozos de las microtiras. Se aplica suero de muestra no diluído seguido por el anticuerpo anti-T. *pallidum* conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).
Los anticuerpos específicos al T. *pallidum* en el suero de prueba y el conjugado, completan la unión al antígeno en los pozos. Enseguida se lava el material no unido. Al añadir el substrato 3.3',5.5'Tetrametil Bencidina. estabilizado (TMB) se desarrollará un color sólo en los pozos donde la enzima está presente. Esto indica la ausencia del anticuerpo humano anti-Treponema *pallidum* siendo por consiguiente un resultado negativo. La reacción de la enzima es detenida añadiendo ácido sulfúrico diluído; enseguida se mide la absorción a 450nm. Cualquier resultado con una densidad óptica (DO) menor que la de corte, se considera positiva. La intensidad del color amarillo producido después de parar la reacción es inversamente proporcional a la concentración de los anticuerpos *T pallidum* en la muestra.
La prueba ha sido calibrara al suero de referencia OMS para las pruebas de serodiagnósticos para las infecciones por treponema. Ref. 3 – 1980

CONTENIDO	Ref OD117	Ref OD157
	96	480
Microtitre Plate — Pozos rompibles cubiertos con antígenos específicos empacados en bolsa de hojilla de aluminio resellable con disecante incluído.	**12 x 8**	**60 x 8**
Control - Reagent 2 — Control negativo, solución transparente de Suero humano negativo a los anticuerpos de *Treponema pallidum*., listo para su uso. (azul).	**0.5 ml**	**2.5 ml**
Control L Reagent 3 — Control positivo bajo solución trnasparente de suero humano. Conteniendo un nivel bajo de anticuerpos al *Treponema pallidum.* Listo para su uso. (verde).	**0.5 ml**	**2.5 ml**
Control H Reagent 4 — Control positivo alto, solución transparente de suero humano conteniendo un alto nivel de anticuerpos. al *Treponema pallidum.* Listo para su uso, (Rojo).	**0.5 ml**	**2.5 ml**
Washbuf 20X Reagent 5 — Concentrado de buffer lavado Buffer basado en tris con detergentes. (incoloro).	**50 ml**	**125ml x 2**
Conj Reagent 6 — Conjugado HRP anti-Treponema pallidum anticuerpos antitreponema pallidum conjugados con preoxidasa de rábano. Listo para su uso. (púrpura).	**15 ml**	**32.5 ml x 2**
Subs TMB Reagent 7 — Solución de sustrato 3.3',5.5'.Tetrametil Bencidina en buffer de citrato. Listo para su uso. (incoloro).	**15 ml**	**11 ml x 5**
Soln Stop H2SO4 0.2M Reagent 8 — Solución de paro: ácido sulfúrico diluído en agua purificada. Listo para su uso, (incoloro).	**15 ml**	**32.5 ml x 2**
Hoja de instrucciones y hoja para registrar los datos EIA.	**1 + 1**	**1 + 5**

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

Micropipetas: 100µl, 200µl, 1000µl and 5000µl
Puntas de micropipetas desechables
Incubadora, Temperatura: 37°C +/- 1°C
Papel absorbente
Lector de microplaca con un filtro de 450nm.
Papel gráfico
Material de vidrio de laboratorio totalmente limpio

PRECAUCIONES

El kit **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** contiene material de origen humano el cual ha sido probado y confirmado como negativo para anticuerpos HCV, HIV I y II y HBsAg a nivel de donante único y por procedimientos aprobados. Ya que ninguna prueba puede asegurar que los productos derivados de fuentes humanas no transmitan agentes infecciosos, se recomienda que los reactivos incluídos en este kit sean manejados con cuidado extremo y atención tanto durante su utilización como al momento de desecharlos. Todos los reactivos deben considerarse como bio peligrosos en su uso y están hechos para descartarse. No ingiera.

Los reactivos del **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** no contienen sustancias peligrosas según las definiciones definidas porlas reglamentaciones de la UK Chemicals (Información de peligro y empaques para suministro).

Sin embargo, todos los reactivos deben tratarse como potencialmente bio peligrosos tanto en su uso como en su disposición final. Esta última debe estar en concordancia con la legislación local.

La solución de paro (Reactivo 8) del **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** ess ácido sulfúrico 0.2M. Por consiguiente, es corrosivo. Maneje con cuidado, En caso de contacto, lave con abundante agua.
Los reactivos del **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** contienen un 0.5% de PROCLIN 300[tm] como preservante el cual puede ser tóxico si se ingiere. En caso de contacto, lave con abundante agua.

*El PROCLIN 300 es una marca registrada de ROHM and HAAS Ltd,.

ALMACENAMIENTO

Los reactivos deben almacenarse en una temperatura de 2°C a 8°C.

La fecha de vencimiento es el último día del mesindicado en la etiqueta de la botella y la etiqueta del kit. El kit se desempeñará dentro de las especificaciones hasta la fecha de vencimiento, según se determina ésta al momento de fabricación y está indicada en el kit y en sus componentes. No use los reactivos pasada la fecha de vencimiento.

Debe evitarse la exposición de los reactivos a temperaturas excesivas. Tampoco los exponga a luz solar directa.

NO CONGELE NINGUNO DE LOS REACTIVOS. Esto causará daño irreversible.

RECOLECCION Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Obtenga una muestra de sangre venosa del paciente y permite que se coagule y se retraiga. Centrifugue la muestra de sangre coagulada y colecte el suero transparente. Se neesitan muestras de suero frescas.

No use suero hemolizado, contaminado y lipémico para la prueba ya que esto afectara notablemente los resultados de la prueba.

El suero puede guardarse a 2°C a 8°C hasta por un periodo de 48 hora antes de efectuar la prueba. Si se requiere almacenamiento prolongado, hágalo a menos -20°C hasta por un año. Las muestras descongeladas deben mezclarse bien antes de efectuar la prueba.

No repita ciclos de congelamiento/descongelamiento pues esto arrojará resultados falsos.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20°C a 25°C) y mezclarse completamente antes de usarse. No induzca la formación de espuma.

Buffer de Lavado
Diluya el buffer de lavado concentrado (reactivo 5) usando una parte de concentrado y 19 partes de agua destilada Prepare para cada tira rompible de 8 pozos, 25 ml de buffer de lavado diluído añadiendo 1.25ml de buffer de lavado concentrado a 23.75ml de agua destilada Prepare una dilución de buffer de lavado fresca antes de cada tiraje de pruebas. Se suministra buffer de lavado adicional para poder iniciar las máquinas de lavado automático.

El procedimiento de lavado es crítico para la obtención del resultado de la prueba. El lavado insuficiente dará como resultado una precisión pobre y unas lecturas de absorción falsamente elevadas.

LIMITACIONES PARA EL USO

El uso de otras muestras aparte del suero no han sido validadas para esta prueba.
Ningún test de hemaglutinación serológica puede discriminar entre anticuerpos debidos a la infección por T.pallidum y anticuerpos debidos a una infecciòn con otros treponemas patógenos, por ejemplo T.pertenue y T.corateum.
No existe un protocolo de re utilización para este producto. Al hacer una interpretación de la prueba, se sugiere vehementemente tener en cuenta considerar todos los datos clínicos, El diagnóstico no se puede hacer basados únicamente en los resultados de una sola prueba.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Los componentes del kit y el suero deben estar a temperatura ambiente de 20° a 25°C.
2. Debe efectuarse la prueba con un solo juego de estándares con cada grupo de del suero de prueba. Sostenga el número deseado de pozos cubiertos en el agarrador. Registre la posición de los estándares y del suero de prueba en la hoja especial suministrada para el registro de datos EIA.
3. Las tiras no usadas deben retornarse a la bolsa de hojilla de aluminio y sellarse totalmente con disecante sellándolas con el zip.lock antes de almacenarse a 2°C-8°C.
4. NO DILUYA EL SUERO DE PRUEBA NI LOS CONTROLES. Distribuya 25µ de suero de prueba o de suero de control (reactivos 2,3 y 4) en los pozos apropiados. El suero de control debe añadirse al final para asegurar la interpretación precisa de los resultados. Inmediatamente después de haber añadido el suero de control y el de prueba distribuya 100µ del conjugado HRP anti-*treponema pallidum* (reactivo 6) a cada pozo que contenga suero de prueba o de control. El conjugado no se puede añadir pasados 30 minutos después de añadir el primer suero. Sacuda suavemente por 5 segundos. Cubra la placa con la tapa de la placa provista y colóquela sobre un pedazo de papel absorbente húmedo en una incubadora a 37°C por 90 minutos.
5. Al final del periodo de incubación elimine el contenido de los pozos sacudiendo el contenido de las placas a un contenedor bio peligroso. Luego golpee los pozos firmemente a un papel absorbente. Asegúrese que el contenedor bio peligroso tenga suficiente desinfectante.
6. Lavado manual Llene los pozos con un mínimo de 300µl de buffer de lavado por pozo. Sacuda el contenido de los pozos a un contenedor bio peligroso Luego golpee los pozos firmemente a un papel absorbente. Lave los pozos desocupados por cinco veces incluyendo un enjuague de 30 segundos.
7. Golpee los pozos firmemente contra papel absorbente o una toalla de papel para quitar todos los residuos de agua en gotitas.
8. Lavado a Máquina: Asegúrese que 300µ de lavado de buffer está distribuido a cada pozo y que un desinfectante apropiado sea añadido a la botella de recolección de desperdicios. Lave los pozos desocupados por cinco veces incluyendo un enjuague de 30 segundos.
9. Distribuya 100µl de de sustrato (Reactivo 7) a cada pozo. Vuela a colocar la tapa sobre la placa y retórnela a la incubadora. Permita que la reacción se desarrolle en la oscuridad a 37°C por 15 minutos.
10. Pare la reacción añadiendo 100µl de solución de paro (Reactivo 8) a cada pozo. Esto producirá un cambio de color de azul a amarillo en los pozos que contenga la enzima que indica la ausencia de los anticuerpos anti-Treponema pallidum. Anule el lector de placa al aire. Mida la absorción de cada pozo a 450nm INMEDIATAMENTE después de parar la reacción.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

El lector de placa debe graduarse a una longitud de onda de 450nm.y anulada en el aire. Al determinar las absorciones de cada espécimen y de control, es preferible no usar un filtro de referencia ya que cambiará los valores esperados de los controles.

PREVENCIÓN DE INCONVENIENTES

Para ser usado por operarios con un mínimo de experiencia en técnicas de laboratorio.

No use los componentes del kit que estén dañados ni contaminados.

Use una punta separada para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

Haga copias de todos los estándares y especímenes que aunque no es indispensable, se recomienda.

Los especímenes y los estándares deben efectuarse al mismo tiempo para mantener las condiciones de prueba iguales.

Se recomienda no usar mas de 32 pozos para cada tiraje de pruebas si se usan pipetas de forma manual ya que el uso de pipetas en todos los estándares y especimenes deben completarse en 3 minutos. Si se dispone de pipetas automáticas, se puede usar una placa completa de 96 pozos.

Tape los reactivos inmediatamente después de su uso.

Evite usar la pipeta repetidamente de los depósitos de reactivos ya que esto muy seguramente causará contaminación.

No mezcle los reactivos ni las tiras cubiertas con anticuerpo de diferentes kits, Al eliminarse se debe evitar tocar la superficie de los pozos.

No permita que los reactivos se escurran en las paredes de los pozos. Antes de comenzar las pruebas, todos los reactivos deberán estar a temperatura ambiente de 20° a 25°C. Mezcle suavemente todos los reactivos girándolos o volteándolos.

Una vez que una prueba ha sido iniciada no se debe permitir que los pozos se sequen durante la prueba.

No contamine la solución de sustrato ya que esto hará todo el kit inoperante.

Revise la precisión y exactitud del equipo de laboratorio usado durante todo el procedimiento para asegurar resultados reproducibles.

Las tiras no usadas deben retornarse a su bolsa de hojilla de aluminio con disecante y sellarse con el zip lok antes de colocarse a la temperatura de 2° y 8°C.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Para cada suero de prueba y control, determine el valor de la densidad óptica promedio (DO) obtenida en los pozos.
Nivel de corte = (Valor DO promedio del duplicado de los controles positivos bajo (Reactivo 3)) x 1.2.
Zona Ambigua = valores DO dentro de o igual a 10% por debajo del nivel de corte.
Validación de la prueba = El DO promedio del control negativo (Reactivo 2) debe ser mayor a 0.8. El control positivos bajo. (Reactivo 3) debe ser mayor a 0.35 y el control positivo alto (Reactivo 4) debe ser menor a 0.6 para que los resultados de la prueba sean válidos.
Resultado Negativo: Un resultado negativo debe tener un valor DO mayor que el valor de corte
Positivo en sospecha: Un resultado bajo o sospechado debe tener un DO menor que la zona ambigua.
Resultado Positivo: Un resultado positivo debe tener un DO menor que la zona ambigua.
Si los niveles de control o las muestras conocidas de los usuarios no dan los resultados esperados los resultados de la prueba deben considerarse inválidos.

DATOS EVALUATIVOS

Calibrados contra los principales competidores y los estándares de la casa
Se probaron 120 muestras en un centro de referencia europeo tomadas de pacientes con diferentes formas de sífilis o de personas no tratadas. El grupo de control de 345 muestras por posibles muestras de reacción cruzada y de muestras negativas conocidas.
Los resultados de sensibilidad y especificidad del la **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** fue de un 100% en ambos casos.
El coeficiente de variación del **PATHOZYME SYPHILIS COMPETITION** es igual o menor a un 10%.

REFERENCIAS

(1) **Cheesbrough, M** (1991). Spirochaetes, Chlamydiae, Rickettsiae, Mycoplasma and Bartonella. In: *Medical laboratory manual for tropical countries. Volume II: Microbiology.* Chap 45:312-318. Butterworth-Heinemann Ltd, Linacre House, Jordan Hill, Oxford.

(2) **Norris, S J & the T. PALLIDUM POLYPEPTIDE RESEARCH GROUP.** (1993). Polypeptides of *Treponema pallidum:* Progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. Microbiol. Rev.57(3). 750-779.

(3) **Independent Evaluation Performed By Bristol Supra Regionaltreponemal Serology UK.** April 1996.

REFERENCIA RAPIDA DEL PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. No diluya ni los controles ni el suero de prueba.
2. Distribuya 25µl del suero de prueba o suero de control en fortaleza de trabajo. (Reactivos 2,3 y 4) a cada pozo seguido de 100 µl de conjugado HRP anti-*Treponema pallidum* (Reactivo 6). El conjugado no debe añadirse pasados 30 minutos después de la adición del primer suero. Sacuda suavemente por 5 segundos.
3. Incube por 90 minutos a 37°C.
4. Elimine los componentes del pozo y lave cinco veces incluyendo un enjuague de 30 segundos después de cada lavada.
5. Distribuya 100 µl de solución de sustrato (Reactivo 7) a cada pozo.
6. Incube en la oscuridad por 15 minutos a 37°C.
7. Distribuya 100 µl de solución de paro (Reactivo 8) a cada pozo.
8. Lea el OD con un lector EIA usando un filtro de 450nm
9. Interprete los resultados según se describe en la sección de la interpretación de los resultados.

8050 ISSUE 9 Revised August 2015 **SPANISH**

© Omega Diagnostics Ltd., 2015

OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 AND ISO 13485 CERTIFIED COMPANY