



BIOGEMA

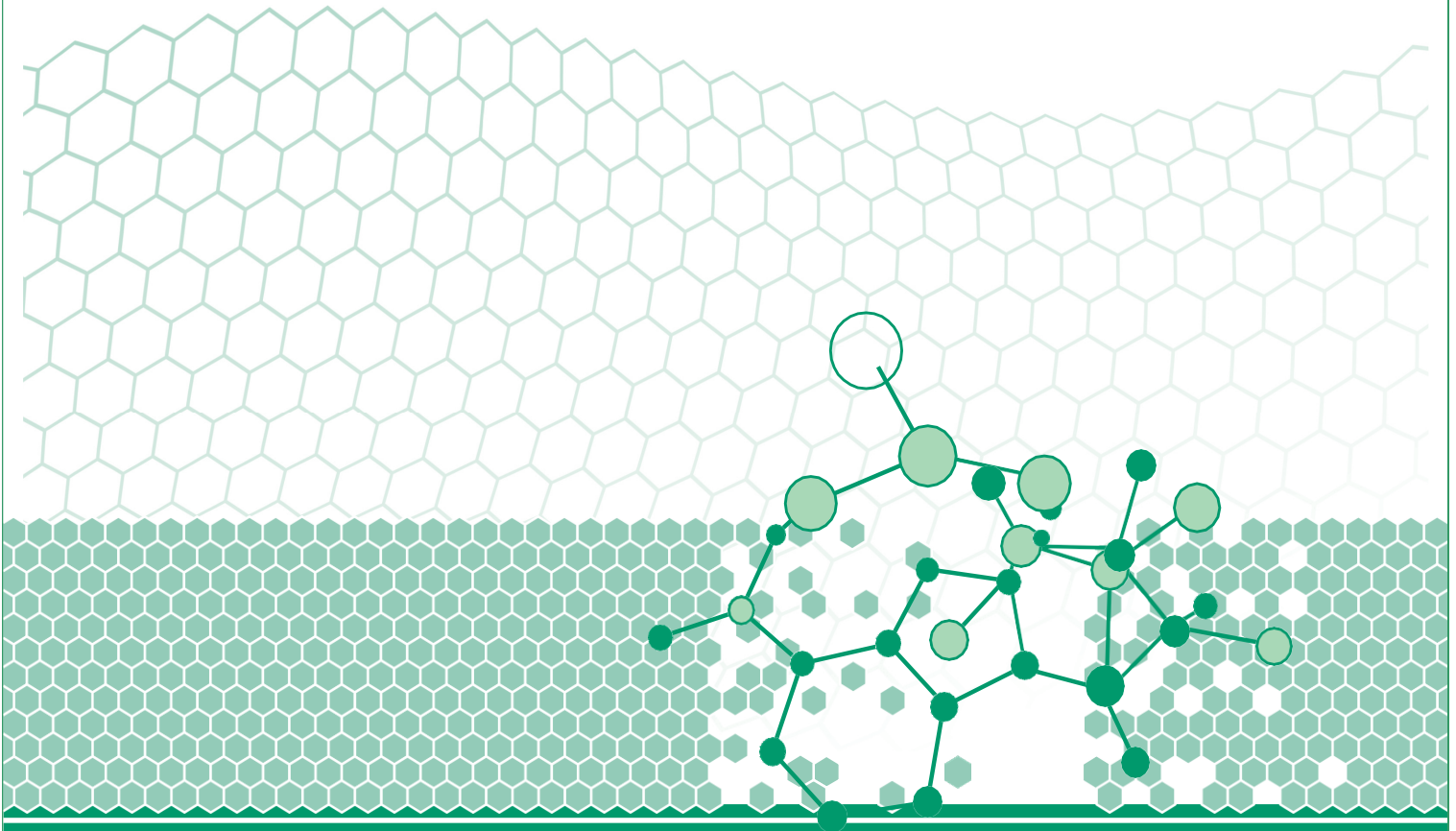
Garbiarska 2, 04001 KOŠICE

Návod na použitie

ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G

REF E-354

**48 jamiiek pre IgA
48 jamiiek pre IgG**



Súprava ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G je určená na stanovenie špecifických protilátok triedy IgA a IgG proti manánovým a glukánovým sekvenciám bunkovej steny *Candida albicans* v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 18 neznámych vzoriek v duplikátoch pre triedu IgA a IgG.

Mykotické infekcie v súčasnosti patria k najrozšírenejším nákazám populácie. Druhy rodu *Candida* ako napr. *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.dublinsiensis* a i. sú fakultatívne patogény spôsobujúce oportúnne infekcie u imunokompromitovaných osôb /HIV+, postransplantačné stavy, malignity, atď./ Zástupcovia rodu *Candida* sú príčinou 79-85% nozokomiálnych mykóz a odhady úmrtnosti sú medzi 50–60%. Kandidóza sa manifestuje prevažne v jednej z dvoch foriem: mukokutánna/superficiálna alebo hematogénne diseminovaná kandidóza. U zdravých osôb *C. albicans* predstavuje saprofytickú flóru gastrointestinálneho a vulvovaginálneho traktu a orofarynxu. *C.albicans* je príčinou kandidózy až u 67% imunokompromitovaných jedincov, pričom mortalita v prípade systémového postihnutia je 30-40%.

PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén manan a glukán, izolovaný z *C. albicans* je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariadeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigén. Po inkubácii sa premytím odstráni nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgA, resp. IgG. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzymová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

ZLOŽENIE

Nezamietať substancie z iných súprav!

1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov aktivovaných antigénom.

2. Štandardy

12 fľaštičiek, 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky IgA a 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky IgG proti *C. albicans* s koncentraciou 0 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 U.ml⁻¹. Štandardy sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie.

3. Kontrolné vzorky

4 fľaštičky, 2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a pozitívnou pre triedu IgA a 2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a pozitívnou pre triedu IgG, sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie. Koncentrácie kontrolných vzoriek sú uvedené v Osvedčení o súprave.

4. Substrát TMB

1 fľaštička (12 ml) s TMB (3,3',5,5'- tetrametylbenzidín). Je pripravený na použitie.

5. Zriedovaci roztok

2 fľaštičky (2 x 50 ml) s TRIS-HCl tlivým roztokom s obsahom bovinného sérového albumínu, 0,2% azidu sodného, 0,02% timerosalu a modrého farbiva, pH 7,0 ± 0,2. Je pripravený na použitie.

6. Vymývaci roztok

1 fľaštička (50 ml). Obsah fľaštičky s vymývacím roztokom doplňte do 1000 ml destilovanou vodou.

7. Konjugáty

2 fľaštičky (2 x 8 ml) s konjugátmi HRP-anti-IgA a HRP-anti-IgG. Sú pripravené na použitie.

8. Kyselina sírová

1 fľaštička (8 ml) s roztokom 0,5 mol.l⁻¹ kyseliny sírovej. Je pripravený na použitie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Súprava je určená na stanovenie vzoriek krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri 2-8 °C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri -20°C. Tieto po rozmrazení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 1:101, t.j. 10 µl séra sa zriedi prídavkom 1 ml zriedovacieho roztoku.

DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporúčame, aby sa štandardy, negatívna, pozitívna vzorka a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužité stripy uchovávajte v obale spolu s vysušovadlom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývaci roztok zo stripov.

PRACOVNÝ POSTUP

1. Pipetujte do jamiek stripov:

- po 20 µl štandardov
- po 20 µl negatívnej kontrolnej vzorky
- po 20 µl pozitívnej kontrolnej vzorky
- po 20 µl pacientskych zriedených vzoriek
- po 100 µl zriedovacieho roztoku do každej jamky

2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.

- Po ukončení inkubácie stripy 4x premyte vymývacím roztokom, pripraveným podľa návodu.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii špeciálna premývačka pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní cca 250 µl vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

- Po ukončení premývania mikrotitračnú doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
- Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP-anti-IgA, resp. HRP-anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
- Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
- Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 100 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
- Vyfarbuje sa 30 min v tme.
- Reakcia sa zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
- Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 – 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hod po skončení vyvíjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

- Keď nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použite nasledovný postup.
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard, kontrolné a pacientske vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesení logaritmu koncentrácií štandardov ($U \cdot ml^{-1}$) na horizontálnu (x) os proti priemerným absorbanciam štandardov na vertikálnu (y) os.
- Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií kontrolných a pacientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne.

Odporúčame nasledovné hodnotenie:

Hodnotenie výsledkov	protlátky IgA	protlátky IgG
Negatívne hodnoty	< 8 $U \cdot ml^{-1}$	< 12 $U \cdot ml^{-1}$
Hraničná hodnota	8 - 20 $U \cdot ml^{-1}$	12 - 30 $U \cdot ml^{-1}$
Pozitívne hodnoty	> 20 $U \cdot ml^{-1}$	> 30 $U \cdot ml^{-1}$

Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek.

KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia nulového štandardu by mala byť menej ako 0,2.

- Absorbancia najvyššieho štandardu by mala byť viac ako 0,8.

Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky sa musia pohybovať v intervale koncentrácií uvedenom v Osvedčení o súprave.

CHARAKTERISTIKA STANOVENIA

Štandardizácia

Štandardy v súprave ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G sú kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

Merací rozsah

6,25-100 $U \cdot ml^{-1}$.

Citlivosť

Detekčný limit súpravy je 5 $U \cdot ml^{-1}$.

Špecifita

Súpravou stanovujeme protilátky triedy IgA a IgG proti *Candida albicans*.

Recovery

Metódou štandardného prídavku sa získajú hodnoty 80 - 120%.

UPOZORNENIE

- Súprava je určená pre profesionálne in vitro použitie v laboratóriu.
- V prípade výskytu nežiaducich príhod, tieto hláste na č. tel. +421 55 6228 131, biogema4@stonline.sk
- Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olivom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Kyselina sírová, v koncentrácii 0,5 mol.l⁻¹, môže pri priamom kontakte s očami alebo pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Azid sodný, timerosal a kyselina sírová v koncentráciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substancii súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu kontrolných vzoriek a štandardov vykazovalo negatívnu reakciu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte rukavice.
- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok. Reagencie nepoužívajte po uplynutí expiračnej doby.

LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame tiež zabezpečiť v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 284/2001 Z.z.

SKLADOVANIE A STABILITA

Súpravu skladujte pri 2 - 8 °C. Doba expirácie súpravy je 12 mesiacov odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

LITERATÚRA:

Buchvald,J.: Mykotické infekcie–aktuálny medicínsky problém. Medicínsky monitor 1/1995, 13-15

Faux,J.,A.: Comparison of specific IgG antibody levels to the cell wall mannan of *Candida albicans* in normal individuals and in patients with primary antibody deficiency. J. Immunol. Methods, 1992, 153, 167-172

Jones,J.M.: Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis. Clin. Microbiol. Rev.: 1990, 3,(1), 32-45

Kondori,N., Edebo,L., Mattsby-Baltzer,I.: Circulating β (1-3) glucan and immunoglobulin G subclass antibodies to *Candida albicans* cell wall antigens in patients with systemic candidiasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2004, 11, 344-350

Kumar,C.P.G., Menon,T., Rohini,P.S., Rajasekaran,S., Sundararajan,T., Venkatesikalau, M.: Anti-*Candida* antibodies and candidemia in ninety patients with HIV/AIDS and cancer. Journal de Mycologie Médicale /Journal of Medical Mycology. 2007, 17, (1), 50-53

Višňovská,D., Buchvald,J.: Štúdiá o šírení zooantroponózneho mikrospórie (*Microsporium canis*) z mačiek na ľudí. Slov. Lek., 1993, 5-6, 37-39

White,L.P., Archer,A.E., Barnes,R.A.: Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infection, with an emphasis on invasive candida infection. J. Clin. Microbiol. 2005, 43,(5), 2181-2187

 EN ISO 9001 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality		Pozorne prečítajte návod na použitie		Podniková norma
 EN ISO 13485 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality pre zdravotnícke pomôcky		Nepoužívať opakovane		Použiť do
	Značka zhody so Smernicou Európskeho parlamentu a Rady 98/79/ES a NV SR č.569/2001 Z.z.		Diagnostický zdravotnícky prostriedok IN VITRO		Jednorazový obal po použití vyhodiť
	Obmedzenie teploty		Výrobca		Neškodí životnému prostrediu
			Číslo šarže		Recyklovateľný obal
			Katalógové číslo		