

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К СИФИЛИСУ

## 1464-6, Syphilis (TPA) IgM

Каталог. № : 1464-6  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 05-13-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тест	Syphilis ELISA
Метод	ИФА: Твердофазный иммуносорбентный анализ
Принцип	ИФА типа сэндвич: Планшет, покрытый антигенами
Диапазон обнаружения	Качественный: Положительный и отрицательный контроли
Образец	10 мкл
Специфичность	95 %
Чувствительность	95 %
Общее время	~ 85 минут
Срок хранения	12-14 месяцев от даты производства

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор DAI Сифилис ТРА-Бледная спирохета IgM ИФА предоставляет материалы для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к Бледной спирохете в сыворотке крови. Набор предназначен только для диагностики In Vitro.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

DAI *Treponema pallidum* IgM ELISA представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Разбавитель образца используется для разбавления образцов пациента, которые затем инкубируются с сорбентом IgG-RF, содержащим гипериммунные античеловеческие антитела класса IgG для исключения конкурентного ингибирования от конкретных IgG, и для удаления ревматоидных факторов. Эта предварительная обработка позволяет избежать ложно отрицательных или ложно положительных результатов. Микротитровальные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигеном *Treponema pallidum*. Предварительно обработанные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации антитела положительных образцов и контролей, специфичные к *Treponema pallidum*, связываются с иммобилизованными антигенами.

После стадии промывки, во время которой удаляется несвязанный образец и контрольные материалы, в лунки добавляются античеловеческие антитела класса IgM, конъюгированные с Peroxidазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgM конъюгат специфически связывается с IgM антителами, которые образуют фермент-связанный иммунный комплекс. После второй промывки для удаления несвязанного конъюгата, сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ и происходит развитие синего окраса. Синий цвет превращается в желтый в результате остановки индикаторной реакции с серной кислотой. Интенсивность этого окрашивания прямо пропорциональна количеству IgM антител, специфичных к *Treponema pallidum*, в образце сыворотки пациента. ELISA ридер с поглощением 450 нм используется для чтения результатов.

### СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

**Образец:** Сыворотка может быть использована в данном анализе. Не используйте гемолитические, желтушные или липемические образцы.

**Сыворотка:** Собрать кровь из вены, дать ей свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Пациентам,

проходящим антикоагулянтную терапию, может понадобиться больше времени для свертывания.

### Хранение образцов

Образцы должны быть закрыты крышками и могут храниться до 5 дней при температуре 2-8 °C до проведения анализа. Образцы, предназначенные для более длительного хранения, следует заморозить при -20 °C до анализа. Пробирки с талыми образцами следует несколько раз перевернуть перед тестированием.

### Разведение образцов

Перед анализом каждый образец пациента должен быть разбавлен Разбавителем для образцов. Для поглощения ревматоидного фактора эти разведенные образцы затем должны быть инкубированы с IgG-RF-сорбентом.

1. Развести каждый образец пациента 1 + 50 Разбавителем образцов; например, 10 мкл образца + 0,5 мл раствора для разведения образцов. Хорошо перемешать.
2. Хорошо перемешать IgG-RF-сорбент перед использованием.
3. Развести этот предварительно разведенный образец 1+1 с IgG-RF-Сорбентом, например, 60 мкл предварительно разведенного образца + 60 мкл IgG-RF-сорбента. **Хорошо перемешать.**
4. **Дать постоять в течение 15 минут при комнатной температуре или в течение ночи при 2-8 °C и хорошо перемешать еще раз.**
5. Взять 100 мкл этих предварительно обработанных образцов для ELISA.

**Пожалуйста, обратите внимание:** контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

### МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

#### Материалы, поставляемые в наборе

1. **Стрипы микропланшета:** ячейки, покрытые анти-человеческим IgM, – 96 ячеек (включая 1 держатель и 1 лист фольги для накрывания).
2. **Разбавитель для образцов:** 1 флакон, 100 мл, готов к использованию, желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **IgG-RF-сорбент:** 1 флакон, 6.5 мл, готов к использованию, желтого цвета; содержит античеловеческие антитела класса IgG.
4. **Положительный контроль:** 1 флакон, 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, красная крышка.
5. **Отрицательный контроль:** 1 флакон, 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, желтая крышка.
6. **Cut-off Контроль:** 1 флакон, 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, черная крышка.
7. **Ферментный конъюгат:** 1 флакон, 20 мл, готов к использованию, красного цвета, антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.
8. **Раствор субстрата:** 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
9. **Стоп-раствор:** 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0.2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Избегать контакта со стоп-раствором. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
10. **Промывочный раствор:** 1 флакон, 30 мл (20X концентрированный на 600 мл), pH 6.5 ± 0,1 (см. "Подготовка реагентов").
  - Содержит безртутные консерванты.

#### Необходимые, но не поставляемые материалы

1. Микротитрационный планшетный калиброванный Ридер (450/620 нм ± 10 нм) DAR 800.
2. Прецизионные микропипетки.
3. Инкубатор 37 °C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Вихревая мешалка.
6. Деионизированная или (свеже) дистиллированная вода.
7. Таймер.
8. Фильтровальная бумага.

#### Подготовка реагентов

Привести все реагенты и необходимое количество стрипов к комнатной температуре перед использованием.

#### Промывочный раствор

Развести *Промывочный раствор 1+19* (напр. 10 мл + 190 мл) свежей дистиллированной водой. Этот разбавленный промывочный раствор имеет значение pH 7.2 ± 0.2.

Расход: ~ 5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Убедитесь, что кристаллы полностью растворились перед использованием.

Разведенный Промывочный раствор стабилен в течение 4 недель при 2 - 8 °С.

#### Общие замечания

1. Пожалуйста, прочитайте внимательно инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от строгого соблюдения протокола испытаний.
2. Очень важно привести все реагенты, образцы и контроли к комнатной температуре перед началом анализа!
3. После того, как тест был запущен, все шаги должны быть завершены без перерывов.
4. Используйте новые пластиковые наконечники для каждого стандарта, контроля или образца во избежание перекрестного загрязнения.
5. Поглощение является функцией времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в держателе и т.д. Это обеспечит равномерное распределение времени раскапывания за шагом без перерыва.
6. Как правило, ферментная реакция прямо пропорциональна времени и температуре.
7. Закрывать флаконы с реагентом сразу после использования во избежание испарения и микробного заражения.
8. После первого вскрытия и последующего хранения проверять флаконы конъюгата и контролей на микробную загрязненность перед дальнейшим использованием.
9. Во избежание перекрестного загрязнения и ложных результатов пипетировать образцы пациентов и раскапывать конъюгат без расплескивания прямо на дно лунок.
10. Во время инкубации накрывать микротитровальные полосы пленкой для предотвращения испарения.

#### ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

Перед проведением анализа развести *Промывочный раствор*, приготовить образцы пациентов как описано в пункте 5.3 и приготовить план распределения и идентификации для всех образцов и контролей.

1. Выбрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.  
Пожалуйста, приготовьте, по меньшей мере:  
1 лунку (например, A1) для бланка субстрата,  
1 лунку (например, B1) для отрицательного контроля,  
2 лунки (например, C1+D1) для Cut-off контроля и  
1 лунку (например, E1) для Положит. Контроля.  
На усмотрение пользователя остается определить, проводить ли анализ контролей и образцов пациентов в двух экземплярах.
2. Распределить  
**100 мкл Отрицат. Контроля** в лунку B1  
**100 мкл Cut-off Контроля** в лунки C1 и D1  
**100 мкл Положит. Контроля** в лунку E1 и  
**100 мкл** каждого предварительно разведенного образца с новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.  
Оставить лунку A1 для бланка субстрата!
3. Накрывать лунки пленкой, поставляемой в комплекте. Инкубировать в течение **60 минут при 37 °С**.
4. Резко вытряхнуть содержимое лунок.  
Промыть лунки 5 раз промывочным раствором (**300 мкл на лунку**). Удар планшетом резко по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшиеся капли.  
**Важное примечание:**  
Чувствительность и точность этого анализа зависят от правильного выполнения процедуры промывки!
5. Внести **100 мкл Ферментного конъюгата** в каждую лунку, за исключением A1.
6. Накрывать лунки пленкой. Инкубировать в течение **30 минут при комнатной температуре (20- 25 °С)**.  
*Не подвергать воздействию прямых солнечных лучей!*
7. Резко вытряхнуть содержимое лунок.  
Промыть лунки **5 раз** промывочным раствором (**300 мкл на лунку**). Удар планшетом резко по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшиеся капли.
8. Добавить **100 мкл Раствора субстрата** во все лунки.
9. Инкубировать ровно 15 минут при комнатной температуре (20-25 °С) в темноте.
10. Остановить реакцию добавлением **100 мкл Стоп-раствора** в каждую лунку. Любое голубое окрашивание, проявившееся во время инкубации, переходит в желтое. **Примечание:** высокоположительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!
11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм в течение 30 минут** после добавления *Стоп-раствора*.

#### Измерение

Отрегулируйте ИФА-ридер на **ноль**, используя **бланк субстрат в лунке A1**.

Если - по техническим причинам - ридер не может быть настроен на **ноль** используя бланк субстрат в лунке A1, вычтеть значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции для получения достоверных результатов!

**Измерить абсорбцию** во всех лунках при **450 нм** и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в плане распределения и идентификации.

Рекомендуется считывание на двух длинах волн, используя длину волны 620 нм как референтную. Где возможно, посчитать средние значения абсорбции всех дублей.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

##### Оценка работы теста

Тест может считаться действительным при соблюдении следующих условий:

**Бланк субстрата в A1:** Значение поглощения ниже **0.100**

**Отрицательный Контроль в B1:** значение абсорбции ниже **0.200**

**Cut-off Контроль в C1/D1:** значение абсорбции **между 0.350–0.800**

**Положит. Контроль в E1:** значение абсорбции **между 0.650-3.000**

#### Расчеты

##### Среднее значение абсорбции Cut-off Контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции двух (2) определений Cut-off Контролей (например, в C1/D1).

**Пример:** (0.44 + 0.46): 2 = 0.45 = CO

#### Интерпретация

- **Отрицательный:** Значения Абсорбции пациентов (Средние) более чем на 10% ниже CO (Среднее ОП пациента < 0.9 x CO)
- **Положительный:** Значения Абсорбции пациентов (Средние) более чем на 10% превышают CO (Среднее ОП пациента > 1.1 x CO)
- **Сомнительный:** Значения Абсорбции пациентов (Средние) на ± 10% CO – повторить тест 2-4 недели спустя - с новыми образцами пациентов (0.9 x CO ≤ Среднее ОП пациента ≤ 1.1 x CO)

Результаты во втором тесте снова в серой зоне ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

#### Результаты в единицах DAI [DU]

Среднее значение Абсорбции пациента x 10 = [DAI Единицы = DU]  
CO

Пример:  $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35 \text{ DU}$

#### Интерпретация результатов

Пороговое значение:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательный:	< 9	DU
Положительный:	> 11	DU

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность анализа получить отрицательный результат в отсутствие конкретного анализируемого вещества. Эта величина составляет 95%.

##### Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность анализа получить положительный результат в присутствии конкретного анализируемого вещества. Эта величина составляет 95%.

#### Правовые аспекты

##### Достоверность результатов

Испытание должно быть выполнено точно в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правил GLP (Надлежащая лабораторная практика) или других применимых национальных стандартов и/или законов. Это особенно актуально для использования контрольного материала. Важно всегда включать в процедуру анализа достаточное количество контролей для оценки точности и достоверности анализа.

Результаты теста действительны только, если все Контроли находятся в пределах указанных диапазонов и, если все другие параметры теста также находятся в пределах данной спецификации

анализа. В случае возникновения сомнений, пожалуйста, свяжитесь с DAi.

### **Терапевтические заключения**

Терапевтические заключения никогда не должны основываться только на результатах лабораторных анализов, даже если все результаты испытаний согласуются с данными, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не должна основываться на основе единого результата теста. При постановке точного диагноза следует принимать во внимание историю болезни, симптоматику, а также серологические данные.

Только в случае, когда результаты лабораторных исследований находятся в приемлемом соответствии с общей клинической картиной пациента, должен устанавливаться окончательный диагноз.

Результат теста сам по себе никогда не должен быть единственным фактором, определяющим терапевтическое заключение.

### **Ответственность**

Любое изменение тестового набора и/или обмен или перемешивание любых компонентов различных партий из одного тестового набора в другой может негативно повлиять на ожидаемые результаты и обеспокоенность общего теста. Такая модификация и/или обмен аннулируют возможность замены набора производителем.

Претензии, предъявленные в связи с неправильным толкованием результатов лабораторных исследований при условиях, указанных выше, также недействительны. Любой ущерб, нанесенный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.

### **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

1. Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли для нормальных и патологических уровней.
2. Кроме того, рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.
3. Если результаты анализа не сходятся с установленными приемлемыми диапазонами контрольных материалов, результат должен считаться недействительным.
4. В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: приборы для пипетирования и фиксации времени; фотометр, сроки годности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.
5. После проверки вышеуказанных элементов, и не находя ошибки, обратитесь к своему дистрибьютору или непосредственно к DAi.

### **ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

1. Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания-оттаивания образца могут влиять на значения абсорбции. У пациентов с иммунодефицитом и новорожденных серологические данные имеют только ограниченные значения.

### **ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ**

1. Данный набор предназначен только для диагностики in-Vitro! Только для профессионального использования.
2. Не используйте реагенты с разных лотов или других наборов. Компоненты набора подобраны точно, чтобы обеспечить максимальную результативность анализа.
3. Уверьтесь в том, что срок годности реагентов не истек, а также, что они из одного лота. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности, указанного на этикетках реагентов или упаковке набора.
4. **ВНИМАНИЕ – КРИТИЧЕСКИЙ ШАГ:** Все реагенты и образцы необходимо привести к комнатной температуре (18-30°) до начала теста. Слегка встряхните реагент перед использованием, и верните к температуре 2-8°С сразу после использования.
5. используйте только достаточное количество образцов, как указано в схеме анализа. В противном случае чувствительность анализа может оказаться очень низкой.
6. Не касайтесь внешней стороны дна лунок; отпечатки пальцев или царапины могут препятствовать считыванию.
7. При считывании результатов убедитесь в том, что дно планшета сухое, а внутри лунок нету воздушных пузырьков.
8. Никогда не давайте лункам микропланшета высохнуть после промывания. Переходите немедленно к следующему этапу. При

добавлении реагентов избегайте образования воздушных пузырьков.

9. Избегайте длительных пауз между этапами анализа. Обеспечьте одинаковые рабочие условия для всех лунок.
10. Часто калибруйте пипетки, чтобы обеспечить точность дозирования образцов/реагентов. Всегда используйте новые одноразовые наконечники для каждого образца и реагента во избежание перекрестной контаминации. Никогда не пипетируйте растворы ртом. Рекомендуется использование автоматических пипеток.
11. Уверьтесь в том, что инкубационная температура внутри инкубатора составляет 37°С.
12. Добавляя образцы, избегайте касания наконечника пипетки дна лунки.
13. При считывании результатов планшетным ридером, рекомендуется установить абсорбцию при 450нм или при 450 нм со ссылкой на 630 нм.
14. Обращайтесь со всеми реагентами и образцами человеческого происхождения как с потенциально инфицированными.
15. В наборе могли быть использованы материалы человеческого происхождения. Они тестировались наборами высокой результативности и являются отрицательными к антителам ВИЧ 1+2 антигены/антитела, вирусу гепатита С, ТР и поверхностному антигену вируса гепатита В. Однако, не существует аналитического метода, способного уверить в полном отсутствии возбудителя инфекции в образцах или реагентах. Поэтому необходимо очень аккуратно обращаться с реагентами и образцами. Строгое соблюдение правил лабораторной практики может обеспечить личную безопасность. Никогда не ежьте, не пейте, не курите и не наносите косметику в лаборатории.
16. В данном наборе могла использоваться бычья сыворотка. Альбумин бычьей сыворотки и сыворотка зародыша теленка взяты у животных, проживающих в географических зонах, безопасных по отношению к возможности заражения ГЭ КРС и ТГЭ.
17. Перед дальнейшей утилизацией все наконечники для пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры для образцов необходимо собрать и подвергнуть паровой стерилизации на протяжении 1 часа при температуре 121°С, либо же обработать гипохлоритом натрия на протяжении 30 минут с целью обеззараживания.
18. Стоп-раствор (2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) является сильной кислотой. Едкий. Используйте осторожно. В случае попадания капель на кожу или в глаза, немедленно вытереть или промыть водой. Консервант ProClin 300 может вызывать чувствительность кожи.
19. Ферментативная активность ксантиноксидазы хрена может пострадать от пыли, реактивных химикатов, растворов типа гипохлорита натрия, кислоты, щелочей и т.д. НЕ проводить анализ в присутствии данных веществ.
20. Сертификат безопасности материала доступен по требованию.
21. В случае использования полностью автоматизированной системы обработки данных микропланшета, не накрывайте планшет крышкой во время инкубации. Можно также упустить выбивание остатков из планшета после промывания.

### **ХРАНЕНИЕ**

1. При хранении при температуре 2-8 °С в закрытом виде, реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты после истечения срока годности.
2. Открытые реагенты должны храниться при 2-8 °С. Микропланшет необходимо хранить при температуре 2- 8 °С. Как только пакет из фольги был открыт, следует позаботиться, чтобы его снова плотно закрыть.
3. Открытые наборы сохраняют активность в течение четырех месяцев, если хранить, как описано выше.



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»