

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР

Бесцветная жидкость в прозрачной бутылке с белой крышкой.

50 мл /бутылку.

pH 7,4, 20 × PBS. (Содержит Tween-20 в качестве детергента).

РАЗВЕСТИ ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ - концентрат разбавить **1:20** с

дистиллированной/деионизированной водой перед использованием. После разбавления стабилен в течение одной недели при комнатной температуре или в течение двух недель при температуре 2-8 °С.

РАСТВОР ХРОМОГЕНА

Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой закрывающейся крышкой.

8 мл/ флакон.

Раствор перекиси мочевины.

Готов к использованию.

После вскрытия стабилен в течение одного месяца при 2-8 °С.

РАСТВОР ХРОМОГЕНА В

Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой.

8 мл/ флакон

Раствор ТМБ (тетраметилбензидин растворяется в лимонной кислоте).

Готов к использованию.

После вскрытия стабилен в течение одного месяца при 2-8 °С.

СТОП РАСТВОР

Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой.

8 мл/ флакон

Разбавленный раствор серной кислоты (2,0 M H₂SO₄).

ПЛАСТИКОВЫЙ ГЕРМЕТИЧНЫЙ МЕШОЧЕК

Для хранения не используемых полосок.

КАРТОННАЯ КРЫШКА ДЛЯ ПЛАСТИНЫ

Для покрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения или загрязнения скважин.

ВКЛАДЫШ ИНСТРУКЦИИ

1 бутылка

1 флакон

1 флакон

1 флакон

1 штука

2 листа

1 копия

Необходимые, но не поставляемые материалы

1. Свежедистиллированная или деионизированная вода.
2. Одноразовые перчатки и таймер.
3. Соответствующие контейнеры для потенциально загрязненных материалов.
4. Одноразовые желобки V-формы.
5. Система для внесения и/или пипетирования (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
6. Фильтровальная бумага или чистое полотенце.
7. Сухой инкубатор или водяная баня, 37 ± 0,5 °С.
8. Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
9. Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 нм и 630 нм.
10. Система для аспирации/промывания лунок.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

1. **Подготовка реагентов:** Привести реагенты и образцы к комнатной температуре (**18-30 °С**) в течение по крайней мере 15-30 минут. Проверьте Концентрат Промывочного буфера на присутствие кристаллов соли. Если кристаллы образовались, Раствор повторно растворить нагреванием при 37 °С до полного растворения кристаллов. Развести Исходный Промывочный буфер **1:20** с дистиллированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления буфера.
2. **Нумерация Лунок:** Установить необходимое количество полосок в держателе и пронумеровать необходимое количество лунок, в том числе три Отрицательных контроля (**например, B1, C1, D1**), два Положительных контроля (**например, E1, F1**) и одного бланка (**например, A1**, в лунку Бланка не добавлять ни образцы, ни HRP-конъюгат). Если результаты будут определяться с помощью ридера с двойной длиной волны, требование использования бланка может быть проигнорировано. Используйте только то количество полосок для анализа, которое необходимо.
3. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавить **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку, кроме Бланка.
4. **Добавление образца:** Добавить **20 мкл** положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие ячейки – смесь HRP-конъюгат-образец в лунках изменит цвет с **ЗЕЛЕННОГО** на **СИНИЙ** после добавления образцов. **Примечание: используйте разные наконечники**

для каждого образца, **Отрицательного, Положительного** контролей, чтобы избежать перекрестного загрязнения.

5. **Инкубация:** Перемешать, легко постукав по планшету. Накрывать планшет пластиной и выдержать в течение **60 минут при 37 °С**. Рекомендуется использовать водяную баню с контролируемой температурой для поддержания стабильной температуры и влажности во время инкубации. Если используется сухой инкубатор, не открывайте дверь часто.
6. **Промывка:** В конце инкубации удалить и уничтожить крышку для накрывания планшета. Тщательно промыть каждую лунку **6 раз** разведенным Промывочным буфером. Каждый раз позволить лункам постоять для впитывания в течение 30-60 секунд. После окончательного промывания перевернуть пластину на бумажное чистое полотенце и вытряхнуть остатки.
7. **Окрашивание:** Добавить **50 мкл** Хромогена А и **50 мкл** Хромогена В в каждую лунку, включая **Бланк**, накрыть пластину крышкой и осторожно перемешать, постукав по пластине. Инкубировать **при 37 °С в течение 15 минут** в темноте. Ферментативная реакция между Раствором хромогена и HRP-конъюгатом приводит к голубому окрасу в Положительном контроле и положительных лунках анти-ТР.
8. **Остановка реакции:** Удалить и уничтожить крышку для накрывания планшета. Используя многоканальную пипетку или ручную, добавить **50 мкл** Стоп раствора в каждую лунку и аккуратно перемешать. Развивается интенсивный желтый окрас для Положительного контроля и положительных лунках анти-ТР.
9. **Измерение абсорбции:** Калибровать планшетный ридер относительно Бланка и считать абсорбцию при **450 нм**. Если используется инструмент с двойным фильтром, установите контрольную длину волны на **630 нм**. Рассчитать Пороговое значение и оценить результаты. (**Примечание:** считайте абсорбцию в течение 5 минут после остановки реакции).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Каждый микропланшет следует рассматривать отдельно при расчете и интерпретации результатов анализа, независимо от количества пластин, анализируемых одновременно. Результаты вычисляются как отношение значения оптической плотности каждого образца (OD) к значению Cut-off (CO) пластины. Если величины Cut-off получены при измерении на ридере с одним фильтром, результаты должны рассчитываться путем вычитания значения OD Бланка из значений образцов и контролей. В случае, если величины Cut-off получены при измерении на ридере с двойным фильтром, не вычитайте значение OD Бланка из значений образцов и контролей.

1. Расчет Порогового значения Cut-off (CO) = * Nc + 0.18

***Nc = среднее значение абсорбции для трех отрицательных контролей**

Пример:

1. Расчет Nc:

№ лунки	B1	C1	D1
Значение OD Отрицательных Контролей	0.032	0.031	0.027

Nc = 0.030

2. Расчет Порогового значения (CO) = 0.030 + 0.180 = 0.210

Если одно из значений Отрицательных контролей не соответствует диапазону Контроля качества, оно должно быть отброшено, и среднее значение вычисляется снова по оставшимся двум значениям. Если более, чем одно из значений Отрицательных контролей не соответствует диапазону Контроля качества, тест недействителен и должен быть проведен повторно.

2. Диапазон контроля качества

Результаты испытаний действительны, если критерии контроля качества проверяются. В каждой лаборатории должны установить соответствующую систему контроля качества с качеством контрольного материала, подобного или идентичного с образцом пациента.

1. Значение ОП лунки Бланка, которая содержит только хромогены и Стоп-раствор, меньше 0.080 при 450 нм.
2. Значение ОП Положительного контроля должно быть равно или больше 0.800 при 450/630 нм или при 450 нм после обнуления.
3. Значение ОП Отрицательного контроля должно быть не менее 0.100 при 450/630 нм или при 450 нм после обнуления.

3. Интерпретация результатов

(S = индивидуальная абсорбция (ОП) каждого образца)

Отрицательные результаты (S/CO < 1): Образцы со значениями поглощения, меньшими, чем значение Cut-off, отрицательны для

этого анализа, что указывает на то, что антитела анти-TP не были обнаружены с помощью этого набора. Таким образом, пациент, вероятно, не инфицирован и нет серологических показаний на перенесенную инфекцию TP.

Положительные результаты (S/CO \geq 1): Образцы со значениями поглощения, большими или равными, чем значение Cut-off, считаются первично реактивными для этого анализа, что указывает на то, что антитела анти-TP были обнаружены с помощью этого набора. Таким образом, пациент, вероятно, не инфицирован и нет серологических показаний на перенесенную инфекцию TP.

Рекомендуется повторное тестирование в дублях любых первично реактивных образцов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на антитела к бледной трепонеме и поэтому есть серологические показания к текущей или перенесенной инфекции TP. Любая единица крови, содержащая антитела к бледной трепонеме, должна быть немедленно уничтожена.

Пограничные (S/CO = 0.9 1.1): Образцы со значениями поглощения между 0.9 и 1.1 считаются пограничными и рекомендуется повторное тестирование этих образцов в дубликатах для подтверждения результатов. Неоднократно положительные образцы могут считаться положительными на наличие антител к TP. Рекомендуется повторное тестирование этих образцов в дублях. Неоднократно положительные образцы можно считать положительными к бледной трепонеме. Требуется дополнительное тестирование с другими аналитическими системами.

ДИНАМИКА И ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические характеристики этого анализа были оценены на панели образцов, полученных от 3400 здоровых доноров крови из 3 банок крови и с помощью панели образцов от 192 Сифилис положительных пациентов (сравнительное исследование с другим имеющимся в продаже диагностическим тестом TP). Результаты оценки приведены ниже. Результаты, полученные в отдельных лабораториях, могут различаться.

Samples	-	+	Confirmed Positive	Specificity	False positives
Donors: 3400	3392	8	5	99.91%	3

Samples	anti-TP ELISA		TRUST/RPR		TPHA		anti-TP ELISA*		
	No	+	-	+	-	+	-	+	-
1 st period	76	70	6	65	11	69	7	68	8
2 nd period	110	110	0	101	9	108	2	109	1
3 rd period	2	2	0	2	0	2	0	2	0
latent period	4	4	0	3	1	4	0	4	0
TOTAL	192	186	6	171	21	183	9	183	9

Atrophic Arthritis	24	0	24	13	11	0	24	3	21
				Control	panel				

Анти-TP ИФА * - другой коммерчески доступный набор анти-TP ИФА.

Аналитическая специфичность

Перекрестная реактивность не наблюдалась с образцами от пациентов, инфицированных вирусом гепатита, ВГС, ВГВ, HTLV, ЦМВ, ВИЧ. Никакой интерференции не наблюдалось от ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл. Хук-эффект не наблюдался в клинических испытаниях. Эксплуатационные характеристики анализа не изменяются при повышенных концентрациях билирубина, гемоглобина и триолеина.

Воспроизводимость		Внутри анализа		Между анализами	
Тип образца	N	Среднее S/CO	CV	Среднее S/CO	CV
Слабо положительный	10	3.35	8.4%	3.23	9.0%
Средне положительный	10	6.75	7.0%	6.40	7.5%
Сильно положительный	10	10.90	4.2%	10.30	4.4%

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Не повторяемые положительные результаты могут быть получены из-за общих биологических и биохимических характеристик метода ИФА. Тест предназначен для достижения характеристик производительности высокой чувствительности и специфичности.

- Любые положительные результаты должны интерпретироваться в сочетании с клинической информацией пациента и другими результатами лабораторных испытаний.
- Если после повторного тестирования изначально реактивных образцов, результаты анализов отрицательные, эти образцы следует рассматривать как неповторяющиеся (ложно положительные) и интерпретироваться как отрицательные. Как и во многих очень чувствительных ИФА, ложно положительные результаты могут быть получены из-за нескольких причин, большинство из которых связаны, но не ограничиваются недостаточной промывкой.
- Распространенные ошибки: наборы после окончания срока хранения, плохая промывка, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры анализа, недостаточно аспирации во время промывки, неспособность добавить образцы или реагенты, оборудование, сроки, объемы, характер и качество образца.
- Распространенность маркера влияет на величины анализа.
- Этот комплект предназначен ТОЛЬКО для анализа индивидуальных образцов сыворотки или плазмы. Не используйте его для тестирования трупных образцов, слюны, мочи или других жидкостей тела, или смешанной крови.
- Это качественный анализ и результаты не могут быть использованы для измерения концентрации антител.

ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ НЕСООТВЕТСТВИЯ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ

- Значения Положительного или Отрицательного контроля, которые находятся вне указанного диапазона Контроля качества, являются индикатором возможного ухудшения реагентов и/или ошибок оператора или оборудования. В таком случае результаты должны быть признаны недействительными и образцы должны быть протестированы повторно. В случае постоянных ошибочных результатов из-за износа или нестабильности реагентов, немедленно заменить реагенты новыми.
- Если после смешивания Растворов Хромогена А и В в лунках цвет смеси становится синим в течение нескольких минут, не продолжать проведение испытаний и заменить реагенты новыми.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Этот набор предназначен ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN-VITRO. ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ИФА анализ является чувствительным к температуре и времени. Чтобы избежать ошибочных результатов, строго следуйте инструкциям процедуры испытания, и не изменяйте их.

- Не используйте реагенты с разных лотов или других наборов. Компоненты набора подобраны точно, чтобы обеспечить максимальную результативность анализа.
- 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.
- 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.
- Используйте только достаточное количество образцов, как указано в схеме анализа. В противном случае чувствительность анализа может оказаться очень низкой.
- Не касайтесь внешней стороны дна лунок; отпечатки пальцев или царапины могут препятствовать считыванию.
- При считывании результатов уверьтесь в том, что дно планшета сухое, а внутри лунок нету воздушных пузырьков.
- Никогда не давайте лункам микропланшета высохнуть после промывания. Переходите немедленно к следующему этапу. При добавлении реагентов избегайте образования воздушных пузырьков.
- Избегайте длительных пауз между этапами анализа. Обеспечьте одинаковые рабочие условия для всех лунок.
- 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.
- Уверьтесь в том, что инкубационная температура внутри инкубатора составляет 37°С.
- 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, TP 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°C, либо же обработать гипохлоритом натрия на протяжении 30 минут с целью обеззараживания.
18. Стоп-раствор (2M H₂SO₄) является сильной кислотой. Едкий. Использовать осторожно. В случае попадания капель на кожу или в глаза, немедленно вытереть или промыть водой. Консервант ProClip 300 может вызывать чувствительность кожи.
19. Ферментативная активность конъюгата пероксидазы 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.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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