

ІНСТРУКЦІЯ
з використання набору реагентів

«Сифіліс–антитіла-скрин-Бест»
Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл
всіх класів до *Treponema pallidum*

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для скринінга зразків сироватки (плазми) крові і спинномозкової рідини людини на присутність антитіл класів М, G и А до *Treponema pallidum* методом імуноферментного аналізу (ІФА). Одностадійний варіант.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, (комплект 3) – 480 аналізів включаючи контролю. Всі набори стрипової комплектації.

Набір адаптований для постановки ІФА на аналітичних аналізаторах відкритого типу («TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD», «MULTISCAN», виробник «Labsystems»,).

СКЛАД НАБОРУ (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет розбірний з імобілізованими рекомбінантними білками (аналоги TrpA, p15, p17, p47 *Treponema pallidum*) – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (К+), прозора рідина з жовтим відтінком – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (К–), рідина з жовтим відтінком – 1 фл.;
- кон'югат, рекомбінантні білки (аналоги TrpA, p15, p17, p47 *Treponema pallidum*), мічені пероксидазою хрому; – 1 фл.;
- розчин для розведення зразків та кон'югату (PP) – 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25) – 1 фл.;
- цитратний буферний розчин (ЦБР) – 1 фл.;
- тетраметілбензидін, концентрат (ТМБ) – 1 фл.,
- стоп-реагент – 1 фл.;
- Набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діагностична чутливість – 100 %.

Діагностична специфічність – 99,9 %.

ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Сироватка (плазма) крові або спинномозкова рідина людини об'ємом не менше 10 мкл.

Зразки до дослідження можна зберігати не більше 7 діб при температурі від 2 до 8 °С або до 3 міс при температурі мінус 20 °С або більш низькою. Допускається тільки однократне заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки перед використанням ретельно перемішати.

Зразки, що містять осад, перед аналізом відцентрифувати протягом 10-15 хв при 2500-3000 об/хв.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

"РУЧНА" ПОСТАНОВКА

Обладнання і матеріали

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

Приготування робочих розчинів для ІФА

Перед роботою витягти набір з холодильника, відкрити упаковку і витримати всі реагенти перед проведенням аналізу не менше 30 хв при температурі від 18 до 25 °С.

Приготування робочого промивного розчину (ФСБ-Т)

При випадній осаді солей в ФСБ-Т(х25) прогріти його при температурі 37 °С до повного розчинення осаду.

При використанні всього планшета 40 мл ФСБ-Т(х25) довести водою очищеною до 1 л.

При дрібній постановці використовувати співвідношення об'ємів ФСБ-Т(х25) і водт, вказані в табл. 1 для різної кількості використовуваних стрипів.

Таблиця 1

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37
Вода очищена, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925

Готовий робочий промивний розчин зберігати при температурі від 2 до 8 °С не більше 14 діб.

Приготування робочого розведення кон'югата

Готувати не менше ніж за 10 хв до використання.

При використанні всього планшета вміст флакона з РР (14 мл) ретельно перемішати і додати в нього 140 мкл кон'югата; знову ретельно перемішати.

При дробовій постановці використовувати співвідношення об'ємів кон'югата і РР, вказані в табл. 2 для різної кількості використовуваних стрипів.

Таблиця 2

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
РР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
кон'югат, мкл	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110

Робоче розведення кон'югата стабільно не менше 3 год при температурі від 18 до 25 °С.

Приготування субстратно-індикаторного розчину

Готувати перед використанням в місці, захищеному від впливу прямого сонячного світла.

При використанні всього планшета у флакон з ЦБР (14 мл) додати 0,7 мл розчину ТМБ, ретельно перемішати.

При дробовій постановці використовувати співвідношення об'ємів ТМБ і ЦБР, вказані в табл. 3 для різної кількості використовуваних стрипів. Для приготування розчину в чисту (бажано одноразову) ємність відібрати необхідний об'єм ЦБР і додати відповідний об'єм ТМБ.

Таблиця 3

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ТМБ, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550

Субстратно-індикаторний розчин стабільний не менше 3 год при температурі від 18 до 25 °С в захищеному від світла місці.

Примітка: Посуд, який контактував з розчином хромогена, відмивати без використання синтетичних мийних засобів.

Приготування інших реагентів

Імуносорбент, К⁺, К⁻, стоп-реагент – готові до використання.

Після відкриття упаковок невикористані реагенти допускається зберігати в щільно закритих упаковках при температурі від 2 до 8 °С до того, як термін придатності спливе.

Проведення ІФА

Увага! Дотримання вказаних нижче температури і часу інкубації планшетів на кожній стадії постановки вскрай важливе для отримання достовірних результатів.

1. Дістати з упаковки рамку планшета і необхідну кількість стрипів. Невикористані стрипи допускається зберігати в щільно закритому пакеті з вологопоглиначем при температурі від 2 до 8 °С до того, як термін придатності спливе.

2. В усі лунки внести по 90 мкл робочого розведення кон'югата в РР.

В одну лунку планшета (напр., А1) внести 10 мкл К⁺.

В дві лунки планшета (напр., В1, С1) внести по 10 мкл К⁻.

В інші лунки внести по 10 мкл досліджуваних зразків, ретельно перемішуючи вміст лунок, при цьому колір рідини в лунках зі зразками сироваток змінюється.

3. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою. Інкубувати 60 хв при температурі 37 °С в захищеному від світла місці.

4.3 допомогою промивача видалити зразки з лунок, 5 разів промити планшет промивним розчином, вносячи в лунки 350-370 мкл розчину. При наявності промивача, який дозволяє проводити промивку в режимі "Overflow", використовувати саме цей режим. Після закінчення промивання видалити залишки вологи з лунок, постукуючи перевернутим планшетом по складеному в декілька шарів фільтрованому паперу.

5. В усі лунки внести по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину, негайно помістити в планшет в захищене від світла місце і витримати 25-30 хв при температурі від 18 до 25 °С.

6. В усі лунки (в тій же послідовності, з якої вносилися субстратно-індикаторний розчин) внести по 100 мкл стоп-реагента, обережно (постукуванням по планшету) перемішати вміст лунок і не більше ніж через 10 хв приступити до реєстрації результатів.

Реєстрація і облік результатів

Результати ІФА реєструвати спектрофотометрично, вимірюючи оптичну щільність (ОЩ) при довжині хвилі 450 нм (допускається використання фільтра порівняння з довжиною хвилі 620 або 650 нм). Виведення спектрофотометра на нульовий рівень ("бланк") здійснювати за повітрям.

Результати ІФА враховуються за таких умов:

Значення ОГ для K^+ не нижче 0,60;

Середнє значення ОГ для K^- не вище 0,25.

В іншому випадку дослідження необхідно повторити.

Розраховувати $OG_{крит}$ за формулою

$$OG_{кр.} = OG(K^-)_{ср} + 0,2$$

де $OG(K^-)_{ср}$ – середнє значення ОП в лунках с K^- .

Негативне значення ОГ K^- і досліджуваних зразків (зі знаком «-») при розрахунку $OG_{крит}$ і аналізі результатів вважати рівними «0,000»

Інтерпретація результатів

Досліджуваний зразок враховувати, як позитивний, якщо значення ОГ даного зразка більше або рівне $OG_{кр.}$

Досліджуваний зразок враховувати як негативний, якщо значення ОГ в лунці з ним менше $OG_{кр.}$

Визначення титра антитіл

Тест-система дозволяє виконати визначення титра антитіл у виявленому позитивному зразку. Для цього на окремому стрипі необхідно провести ІФА з відповідним зразком у послідовних двократних розведеннях його розчином РР от 1:10 до 1:1280.

Для приготування вказаних розведень у верхню лунку стрипа внести 20 мкл виявленого позитивного зразка, у інші лунки сипа – по 10 мкл розчину РР. Потім з верхньої лунки стрипа перенести 10 мкл зразка у другу лунку перемішувати пікетуванням і перенести 10 мкл ториманого розведення (1:20) у другу лунку і так – до останньої лунки стрипа. З останньої лунки стрипа відібрати 10 мкл розведення (1:1280) і злити його в дезінфікуючий розчин. В кожну лунку додати по 90 мкл робочого розведення кон'югата.

Стрип закрити, витримати 60 хв при температурі 37 °С і далі провести аналіз згідно з дійсною інструкцією.

Титром антитіл вважати максимальне розведення зразка, при якому ОЩ у відповідній лунці вище $ОЩ_{кр.}$

При спостереганні за хворим в динаміці достовірним вважати зміну титра антитіл не менше ніж в 4 рази, в кожній постановці обов'язково визначати ОЩ для K^+ і K^- з наступним розрахунком $ОЩ_{кр}$ за вказаною вище формулою.

Визначення титра антитіл з допомогою

Зразок, в якому необхідно визначити титр антитіл, слід проаналізувати в двох варіантах: в цільній сироватці і в розведенні 1:10.

Розведення виконується в лунці планшета, ждя чого в лунку планшета внести 90 мкл РР і 10 мкл досліджуваного зразка.

Приготувати аналогічне розведення K^+ .

В одну лунку внести 10 мкл цільного досліджуваного матеріала, в іншу лунку 10 мкл його розведення 1:10. Паралельно в інші лунки внести по 10 мкл K^+ , цільного і в розведенні 1:10, і 10 мкл K^- , цільного.

В усі лунки внести по 90 мкл робочого розведення кон'югата.

Заклеїти планшет і інкубувати 60 хв при 37 °С.

Далі провести ІФА, як описано вище.

Титр антитіл в цільних зразках, що дали ОП нижче 0,6, приймається рівним 1:10. Для оцінки титра в зразках, що дали ОГ вище 0,6, використати коефіцієнт позитивності, який розраховується для K^+ і кожного досліджуваного зразка за формулою:

$$КП = OG_{1:10} / OG_{кр.}$$

де $OG_{1:10}$ – оптична щільність K^+ і досліджуваних зразків в розведенні 1:10;

$OG_{кр.}$ – крайнє значення ОГ, визначене при якісному дослідженні.

Отримані значення КП використовувати для визначення титра за таблицею 4.

Таблиця 4

Значення КП	0,46 і нище	0,47 -0,89	0,9-1,7	1,71-3,29	3,3- 6,69	6,7-8,99	9,0-13,0	13,1 і вище
Титр зразка	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560

Результати визначення титра досліджуваних зразків по КП дійсні тільки в разі, якщо отриманий в цьому дослідженні титр K^+ не відрізняється від титра, вказаного в паспорті данної серії набору.

ПОСТАНОВКА З ВИКОРИСТАННЯМ ІФА-АНАЛІЗАТОРІВ

Підготувати прилад згідно з інструкцією по його експлуатації, ввести програму аналізу, що відповідає використовуваному набору, і провести аналіз.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 10 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися в **ТОВ «Бест Діагностик»** за адресою:
04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9,
тел./факс: (044) 500-57-11
e-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право в разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції

**КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ ІФА
(«Сифіліс–антитіла-скрин-Бест»)**

<u>Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією !</u>	
Внести	по 90 мкл робочого розведення кон'югату в РР у всі лунки; в лунку А1 – 10 мкл К ⁺ , в лунки В1, С1 – по 10 мкл К ⁻ , в інші – по 10 мкл досліджувальних зразків
Інкубація	60 хв, 37 °С
Промити	5 разів промивочним розчином
Внести	по 100 мкл індикаторного розчину в кожную лунку
Інкубація	25-30 хв, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагенту в кожную лунку
Виміряти	ОЩ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по повітрю