

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Генеральний директор
ТОВ «Бест Діагностик»
_____ О.В. Шкурдай
«__» _____ 2012 р.

ІНСТРУКЦІЯ
з використання набору реагентів

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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір «Сифіліс–антитіла-Бест» призначений для скрінінга зразків сироватки (плазми) крові і спинномозкової рідини людини на присутність антитіл класів М, G и А до *Treponema pallidum* методом імуноферментного аналізу (ІФА). Двостадійний 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 антигенами *Treponema pallidum*) – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (К+), рожевий – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (К–), жовтий – 1 фл.;
- розчин кон'югату, (РК) антитіла проти імуноглобулінів класів G, M и A до *T. pallidum*, – 1 фл.;
- розчин для розведення сироваток (РРС) – 1 фл.;
- розчин для промивання, концентрат фосфатного буферу розчину (ФСБ-Тх20) – 1 фл.;
- тетраметілбензидін, розчин (ТМБ) – 1 фл.,
- стоп-реагент – 1 фл.;
- Набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для закляювання планшетів, бланком для внесення проб.

АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діагностична чутливість – 100 %.

Діагностична специфічність – 99,9 %.

Обладнання і матеріали

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

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.

ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

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.

Підготовка реагентів

Всі реагенти тест-системи «Сифіліс–антитіла-Бест» витримати при кімнатній температурі 18-25°С протягом 30 хвилин перед використанням.

Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та зберігайте щільно закритим на замок при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

Приготування розчину для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

Процедура аналізу

Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

Заповнити бланк внесення проб.

Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

Внести в усі лунки планшета по 80 мкл розчину для розведення сироваток.

Внести в лунки по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій.

Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37°C.

Процедура промивання

По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті «процедура промивання»

«Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником, обережно відбирати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, вносити по 100 мкл розчину ТМБ в лунки

Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$OG K_{- \text{середнє}} = (OG K_{-1} + OG K_{-2} + OG K_{-3})/3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО);

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,1 ОО;

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$OG K_{- \text{середнє}} \times 0,5 \leq OG K_{-n} \leq OG K_{- \text{середнє}} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення К- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,30, тобто

$$\text{Граничне значення} = \text{ОГ К-}_{\text{середнє}} + 0,30$$

Розрахувати «сіру зону» значень ОГ, що знаходиться до 10 % нижче від граничного значення тест-системи «Сифіліс–антитіла-Бест», тобто

$$0,9 \times \text{ГЗ} \leq \text{Сіра зона} \leq \text{ГЗ}$$

10.3. Інтерпретація результатів

Зразки із значенням оптичної густини нижче «сірої зони» значень ОГ вважаються **негативними** в тест-системі «Сифіліс–антитіла-Бест».

Досліджувані зразки в межах «сірої зони» значень ОГ вважати **невизначеними**. Такі сироватки слід дослідити повторно в двох лунках тест-системи.

Зразки із значенням ОГ вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи «Сифіліс–антитіла-Бест». Після повторного тестування **позитивними** в тест-системі «Сифіліс–антитіла-Бест» вважаються зразки, ОГ котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні ОГ зразка в обох повторях була нижче граничного значення таку сироватку вважати негативною.

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

Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією !									
Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C									
Приготувати	розчин для промивання планшету, розвести 20х концентрат розчину для промивання Tr100 очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води Заповнити бланк внесення проб для аналізу								
Внести	в лунки планшету по 80 мкл розчину для розведення сироваток								
Внести	по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки: A1 – позитивний контроль, B1, C1 та D1 – негативний контроль, E1 та решта лунок – досліджувані зразки <i>Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій</i>								
Інкубація	заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C								
Промити	5 разів промивочним розчином								
Внести	в лунки стрипів по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)								
Інкубація	заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C								
Промити	5 разів промивочним розчином								
Внести	в лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату								
Інкубація	інкубувати 30 хв. в темряві при кімнатній температурі 18-25°C								
Внести	по 100 мкл стоп-реагенту в кожен лунку								
Виміряти	оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм								
Розрахувати	граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Сифіліс–антитіла-Бест» за формулою: $\text{ГЗ} = \text{ОГ К-}_{\text{середнє}} + 0,30$								
Провести	облік результатів аналізу згідно таблиці: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Значення оптичної густини</td> <td style="width: 50%;">Результат</td> </tr> <tr> <td>$\text{ОГ}_{\text{зразка}} > \text{ГЗ}$</td> <td>позитивний</td> </tr> <tr> <td>$0,9 \times \text{ГЗ} \leq \text{ОГ}_{\text{зразка}} \leq \text{ГЗ}$</td> <td>невизначений</td> </tr> <tr> <td>$\text{ОГ}_{\text{зразка}} < 0,9 \text{ ГЗ}$</td> <td>негативний</td> </tr> </table>	Значення оптичної густини	Результат	$\text{ОГ}_{\text{зразка}} > \text{ГЗ}$	позитивний	$0,9 \times \text{ГЗ} \leq \text{ОГ}_{\text{зразка}} \leq \text{ГЗ}$	невизначений	$\text{ОГ}_{\text{зразка}} < 0,9 \text{ ГЗ}$	негативний
Значення оптичної густини	Результат								
$\text{ОГ}_{\text{зразка}} > \text{ГЗ}$	позитивний								
$0,9 \times \text{ГЗ} \leq \text{ОГ}_{\text{зразка}} \leq \text{ГЗ}$	невизначений								
$\text{ОГ}_{\text{зразка}} < 0,9 \text{ ГЗ}$	негативний								

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 вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції