

ІНСТРУКЦІЯ
з використання набору реагентів
"Сифіліс-IgM-Бест"

Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу М до *Treponema pallidum*

ПРИЗНАЧЕННЯ

Виявлення антитіл класу М до *Treponema pallidum* в сироватці (плазмі) крові і лікворі людини методом імуноферментного аналізу (ІФА). Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи.

СКЛАД НАБОРУ (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет розбірний з імобілізованими антитілами проти IgM *Treponema pallidum* – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (К+), прозора рідина з жовтим відтінком – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (К–), прозора рідина з жовтим відтінком – 1 фл.;
- кон'югат, рекомбінантні білки p17, p47 *Treponema pallidum*, мічені пероксидазою хрому; – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (РРК) – 1 фл.;
- розчин для розведення зразків (РРЗ) – 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 до *Treponema pallidum* – 100 %.
Діагностична специфічність – 99,8%.

ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Сироватка (плазма) крові людини об'ємом не менше 10 мкл або ліквор людини об'ємом не менше 50 мкл.

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

Не допускається використання для дослідження зразків з підвищеним вмістом ліпідів і (або) з ознаками гемоліза, і (або) з видимим мікробним приростом.

Зразки, що містять осад, перед аналізом від центрифугувати 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 реагентів 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 випаданні осаду солей в ФСБ-Т(х25) прогріти його при температурі 37 °С до повного розчину осаду. При використанні всього планшета вміст флакона з ФСБ-Т(х25) довести водою очищеною до 1 л.

При дробовій постановці використовувати співвідношення об'ємів ФСБ-Т(х25) і води, 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 1,4 мл кон'югата внести у флакон з РПК (14 мл), ретельно перемішати.

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

Таблиця 2

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
РПК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
кон'югат, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1

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

Приготування субстратно-індикаторного розчину.

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

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

При дробовій постановці використовувати співвідношення об'ємів ТМБ и 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 у 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.

Приготування інших реагентів

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

РРЗ перед вживанням інтенсивно перемішати.

Примітка: Слід виключити дію прямого сонячного світла на РРЗ, щоб уникнути зміни кольору індикатора.

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 вкрай важливе для отримання достовірних результатів.

1. Дослідження сироватки (плазми) крові

1.1. Витягти з упаковки рамку планшета і необхідну кількість стрипів. Невикористані стрипи зберігати в щільно закритому пакеті з поглиначем вологи при температурі від 2 до 8 °С до того, як термін придатності спливе.

1.2. В усі лунки внести по 90 мкл РРЗ.

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

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

В інші лунки внести по 10 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові.

З допомогою автоматичної піпетки ретельно перемішати вміст лунок, при цьому колір рідини в лунках зі зразками сироваток змінюється.

1.3. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою. Інкубувати 30 хв при температурі 37 °С в захищеному від світла місці.

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

1.5. В усі лунки внести по 100 мкл робочого розведення кон'югата.

1.6. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою. Інкубувати 30 хв при температурі 37 °С в захищеному від світла місці.

1.7.3. з допомогою промивача видалити рідину з лунок, 5 разів промити планшет, як вказано в п. 4.

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

1.9. 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.

2. Дослідження ліквора

Можна проводити одночасно з дослідженням сироватки (плазми) крові.

При цьому для постановки ІФА необхідно використовувати робоче розведення кон'югата в 2 рази більш концентроване, ніж при дослідженні сироватки (плазми).

Для дослідження ліквора у відповідні лунки внести по 50 мкл досліджуваних зразків ліквора і потім додати до них по 50 мкл РРЗ. Далі провести аналіз, як при дослідженні сироватки (плазми) крові.

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 наступних умов :

Значення ОЩ (К+) не менше 0,60;

Середнє значення ОЩ (К-) не більше 0,25.

В іншому разі дослідження необхідно повторити.

Вирахувати крайнє значення ОЩ (ОЩ_{кр.}) за формулою:

$$ОЩ_{кр.} = ОЩ (К^-)_{ср} + 0,2$$

де $ОЩ(К^-)_{ср}$ - середнє значення ОЩ в лунках з К-

Інтерпритація результатів

Досліджуваний зразок враховувати як позитивний, якщо значення ОЩ даного зразка більше або рівне ОЩ_{кр.}.

Досліджуваний зразок враховувати як негативний, якщо значення ОЩ в лунці з ним менше ОЩ_{кр.}.

Титрування позитивного зразка

Тест-система дозволяє виконувати визначення титра антитіл у виявленому позитивному зразку. Для цього на окремому стрипі необхідно провести ІФА з відповідним зразком у послідовних двократних розведеннях його РРЗ від 1:10 до 1:1280. Для приготування вказаних розведень у верхню лунку стрипа внести 180 мкл РРЗ, а в інші – по 100 мкл РРЗ. Потім у верхню лунку стрипа внести 20 мкл виявленого позитивного зразка, ретельно перемішати пікетуванням і перенести 100 мкл отриманого розведення (1:10) у другу лунку, ретельно перемішати пікетуванням, перенести 100 мкл отриманого розведення (1:20) в третю лунку і так – до останньої лунки стрипа. З останньої лунки відібрати 100 мкл розведення (1:1280) і злити його в посудину з дезрозчином. Стрип закрити, витримати 30 хв при температурі 37 °С і потім провести аналіз, як описано вище.

Титром антитіл вважати максимальне розведення зразка, для якого ОП у відповідній лунці буде вище за ОЩ_{кр.}

ПОСТАНОВКА З ВИКОРИСТАННЯ ІФА-АНАЛІЗАТОРІВ

Підготувати прилад згідно з інструкцією з його експлуатації, ввести програму аналізу, яка 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-IgM-Бест)

Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією !

Внести	по 90 мкл РРЗ 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	30 хв, 37 °С
Промити	5 разів промивочним розчином
Внести	по 100 мкл кон'югата в кожен лунку
Інкубація	30 хв, 37 °С
Промити	5 разів промивочним розчином
Внести	по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину в кожен лунку
Інкубація	25-30 хв, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в кожен лунку
Виміряти	ОЩ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по повітрю