

ІНСТРУКЦІЯ
з використання набору реагентів

"Сифіліс-IgG -Бест"

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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для первинного аналізу зразків сироватки (плазми) крові і спинномозкової рідини (СМР) людини на присутність антитіл класу G до *Treponema pallidum* методом непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) на твердофазному носії при "ручній" постановці і з використанням ІФА-аналізаторів.

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 Ig G *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, антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини класу G, 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 – 100 %.

Діагностична специфічність – 99,9 %

ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Сироватка (плазма) крові об'ємом не менше 10 мкл або СМР людини об'ємом не менше 50 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 одноразове заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки перед дослідженням слід ретельно перемішати. Не допускається використання для дослідження зразків з підвищеним вмістом ліпідів і (або) з ознаками гемолізу, і (або) з видимим мікробним проростом.

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 з холодильника, відкрити упаковку і втримати всі реагенти перед проведенням не менше 30 хв при температурі від 18 до 25 °С.

Приготування робочого промивного розчину (ФСБ-Т)

При випадання осаду солей ФСБ-Т(х25) прогріти його при температурі 37 °С до повного розчинення 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 розчину кон'югата

Готувати не менше ніж за 10 хв до використання.

При використанні всього планшета 560 мкл кон'югата внести у флакон з РРК (14 мл), ретельно перемішати.

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

Таблиця 2

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
РРК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
кон'югат, мкл	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440

Для дослідження спинномозкової рідини необхідний об'єм кон'югату збільшити в 4 рази.

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 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 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, K^+ , K^- , РРЗ, стоп-реагент – готові до використання. РРЗ перед використанням перемішати.

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

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. Якісне дослідження

1.1. Дослідження сироватки (плазми) крові

1.1.1. Витягти з упаковки 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.

1.1.2. Внести в усі лунки по 90 мкл РРЗ.

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

В дві лунки планшета (напр., В1, С1) внести по 10 мкл K^- .

В інші внести по 10 мкл досліджуваних зразків.

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

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

1.1.4. З допомогою промивача видалити зразки з лунок, 5 разів промити планшет промивним розчином, вносячи в лунки 350-370 мкл розчину. При наявності промивача, що дозволяє промивку в режимі "Overflow", використовуючи саме цей режим. Після закінчення промивки залишки розчину видалити з лунок, постукуючи перевернутим планшетом по складеному в декілька шарів фільтрованому папері.

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

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

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

1.1.8. В усі лунки внести по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину, негайно помістити планшет в захищене від світла місце і витримати 15-20 хв при температурі від 18 до 25 °С.

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

1.2. ДОСЛІДЖЕННЯ СМР

1.2.1. Витягти 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.

1.2.2. В три лунки (напр., А1, В1, С1) внести по 90 мкл РРЗ, в інші – по 50 мкл РРЗ (РРЗ перед внесенням обов'язково інтенсивно збовтати).

1.2.3. В лунку А1 внести 10 мкл К⁺.

В лунки В1, С1 внести по 10 мкл К⁻.

В інші внести по 50 мкл досліджуваних зразків.

1.2.4. Потім провести аналіз як при дослідженні сироватки (плазми) крові з використанням розведення кон'югата, в 4 рази меншого порівняно з дослідженням сироватки (плазми) крові.

Реєстрація і облік результатів якісного дослідження

Результати ІФА реєструвати спектрофотометрично, вимірюючи оптичну щільність (ОЩ) при довжині хвилі нм (допускається використання фільтра порівняння з довжиною хвилі 620 або 630 нм). Виведення спектрофотометра на нульовий рівень ("бланк") здійснювати за повітрям. Результати ІФА враховуються за наступних умов:

значення ОЩ для К⁺ не менше 0,60;

середнє значення ОЩ для К⁻ не більше 0,25.

При дотриманні всіх цих умов можна приступати до обліку результатів аналізу досліджуваних зразків. В іншому разі дослідження необхідно повторити.

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

$$\text{ОЩ}_{\text{кр.}} = \text{ОЩ}(\text{К}^-)_{\text{ср}} + 0,2$$

де $\text{ОЩ}(\text{К}^-)_{\text{ср}}$ - середнє значення ОЩ в лунках с К⁻.

Негативні значення ОЩ К⁻ і досліджуваних зразків (со знаком «-») при розрахунку ОЩ_{кр.} і аналізі результатів вважати рівними «0,000»

Зразок враховувати як позитивний, якщо значення ОЩ данного зразка більше ОЩ_{кр.}

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

Зразки зі значеннями ОЩ, рівними ОЩ_{кр.}, враховувати як "сумнівні", їх дослідження необхідно повторити

2. Титрування позитивного зразка

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

Для приготування вказаних розведень у верхню лунку стрипа внести 180 мкл розчину РРЗ, в інші лунки стрипа – по 100 мкл розчину РРЗ. Потім у верхню лунку стрипа внести 20 мкл виявленого позитивного зразка, ретельно перемішати пікетуванням і перенести 100 мкл отриманого розведення (1:10) в другу лунку, ретельно перемішати пікетуванням, перенести 100 мкл отриманого розведення (1:20) в третю лунку і так – до останньої лунки стрипа. З останньої лунки стрипа відібрати 100 мкл розведення (1:1280) і злити його в дезінфікуючий розчин. Стрип закрити, витримати 30 хв при температурі 37 °С і потім провести аналіз згідно з дійсною інструкцією.

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

При спостереженні хворого в динаміці достовірним вважати зміну титра антитіл не менше ніж в 4 рази.

Визначення титра антитіл в сироватці (плазмі) за допомогою коефіцієнта позитивності

В цілях зниження вартості аналізу можливе визначення титра в зразках сироватки (плазми) крові за допомогою коефіцієнта позитивності (КП).

Для цього зразки слід аналізувати в розведеннях 1:10 і 1:100.

Для проведення теста в дві лунки планшета внести по 90 мкл РРЗ. Потім в першу лунку внести 10 мкл досліджуваного зразка (розведення 1:10), перемішати пікетуванням 3-4 рази, відібрати 10 мкл розведеної сироватки і перенести в другу лунку, отримавши розведення 1:100.

Паралельно в інші лунки внести К⁺ в розведеннях 1:10 і 1:100 і К⁻ в розведенні 1:10.

Заклеїти планшет плівкою і інкубувати 30 хв при 37 °С. Потім провести ІФА, як описано вище.

Титр антитіл в зразках, що дали розведення 1:10 ОЩ нижче 0,6, приймається рівним 1:10. Для оцінки титра в зразках, що дали ОЩ вище 0,6, використовувати коефіцієнт позитивності, який розрахований для К⁺ і кожного досліджуваного зразка за формулою:

$$\text{КП} = \text{ОЩ} 1:100 / \text{ОЩ}_{\text{кр.}}$$

де $\text{ОЩ}_{1:100}$ – оптична щільність К⁺ і досліджуваних зразків в розведенні 1:100;

ОЩ_{кр.} – порогове значення ОЩ, визначене при якісному дослідженні.

Отримані значення КП використовувати для визначення титра по табл. 4.

Таблиця 4

Значення КП	0,65 і нижче	0,66-0,96	0,97-1,9	1,91-2,99	3,0-4,3	4,31-5,49	5,5-6,95	6,96-9,19	9,2 і вище
Титр зразка	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120 і вище

Результати визначення титра досліджуваних зразків по КВ дійсні тільки в тому разі, якщо отриманий в цьому дослідженні титр К⁺ не відрізняється від титра, вказаного для даної серії набору.

ПОСТАНОВКА З ВИКОРИСТАННЯМ ІФА-АНАЛІЗАТОРІВ

Підготувати прилад згідно з інструкцією з його експлуатації, ввести програму аналізу, відповідну 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-IgG-Бест)

<u>Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією!</u>	
Внести	<i>Дослідження сироватки (плазми крові)</i> по 90 мкл РРЗ в усі лунки; в лунку А1 – 10 мкл К ⁺ , в лунки В1, С1 – по 10 мкл К ⁻ , в інші – по 10 мкл досліджуваних зразків
	<i>Дослідження ліквора</i> в лунки А1, В1, С1 – по 90 мкл РРЗ, в інші лунки – по 50 мкл РРЗ; потім в лунку А1 – 10 мкл К ⁺ , в лунки В1, С1 – по 10 мкл К ⁻ , в інші – по 50 мкл досліджуваних зразків
Інкубація	30 хв, 37 °С
Промити	5 разів промивним розчином
Внести	по 100 мкл кон'югата в кожен лунку
Інкубація	30 хв, 37 °С
Промити	5 разів промивним розчином
Внести	по 100 мкл індикаторного розчину в кожен лунку
Інкубація	15-20 хв, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в кожен лунку
Виміряти	ОЩ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - за повітрям