

**ІНСТРУКЦІЯ**  
 з використання набору реагентів

**«Сифіліс-Блот-БЕСТ»**

Тест-система для виявлення або підтвердження наявності антитіл до окремих антигенів збудника сифілісу (*Treponema pallidum*) методом імунного блотингу з використанням рекомбінантних антигенів.

**Призначення**

Ідентифікація антитіл до *Treponema Pallidum* методом лінійного імуноферментного аналізу (лінійного імуноблота) та підтвердження результатів скрінингових досліджень (в РПР, РПГА або ИФА) зразків сироватки або плазми крові людини або зразків ліквора на присутність антитіл до *Treponema Pallidum* при "ручній" постановці і з використанням систем для автоматизації імуноного блотингу.

Набір адаптований для постановки ИФА на аналітичних аналізаторах відкритого типу («**ProfiBlot**», виробник «**TECAN**», «**Autoblot**», виробник «**Bio-Rad**», та інш.)

**СКЛАД І КОМПЛЕКТЦІЯ НАБОРА**

Набір випускається в двох базових варіантах комплектації (комплект № 1 та комплект № 2 для автоматичних аналізаторів):

Імуносорбент	тест-смужки (стрипи) з нітроцелюлозної мембрани, на кожен з яких у вигляді поперечних смужок нанесені рекомбінантні аналоги антигенів <i>Treponema pallidum</i> (TpN15, TpN17, TmpA, TpN47), а також п'ять контрольних смуг: контролі інтенсивності забарвлення: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Смуга з мінімальною інтенсивністю забарвлення ("0,5+")</li> <li>• Смуга з середньою інтенсивністю забарвлення ("1+").</li> <li>• Смуга з максимальною інтенсивністю забарвлення ("3+");</li> </ul> Контроль внесення зразка (K <sub>BO</sub> ) Контроль специфічності реакції (K <sub>AG</sub> ) (див. рис. 1). <u>Примітки:</u> Смуга "0,5+" відповідає критичному рівню інтенсивності забарвлення. Нанесені на стрипи антигени візуально не визначаються. Стрипи промарковані в пластмасовому контейнері (пробірці з кришкою)	компл. № 1	компл. № 2
Контрольний позитивний зразок (K <sup>+</sup> )	Інактивований, прозора рідина світло-жовтого кольору	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)
Контрольний негативний зразок (K <sup>-</sup> )	інактивований, прозора рідина світло-жовтого кольору	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)
Кон'югат (концентрат)	Антитіла козячі до IgG людини, кон'юговані з лужною фосфатазою в стабілізуючому розчині, прозора рідина фіолетового кольору	1 фл. (1,0 мл)	-
Кон'югат	Антитіла козячі до IgG людини, кон'юговані з лужною фосфатазою в стабілізуючому розчині, прозора рідина фіолетового кольору	-	1 фл. (45 мл)
Розчин для розведення кон'югату (РРК)	Мутна рідина, яка піниться рожевого кольору	1 фл. (45 мл)	-
Розчин для розведення зразків (РРЗ)	Мутна рідина, яка піниться зеленого кольору	1 фл. (30 мл)	1 фл. (30 мл)
10-разовий концентрат промивного розчину [ПР(x10)]	Прозора рідина, що злегка піниться жовтого кольору	1 фл. (50 мл)	1 фл. (50 мл)
Субстратний розчин (СР)	Прозора рідина світло-зеленого кольору	1 фл. (45 мл)	1 фл. (45 мл)

Примітка. Набір включає всі реагенти, необхідні для аналізу, крім очищеної (дистильованої або деонізованої) води.

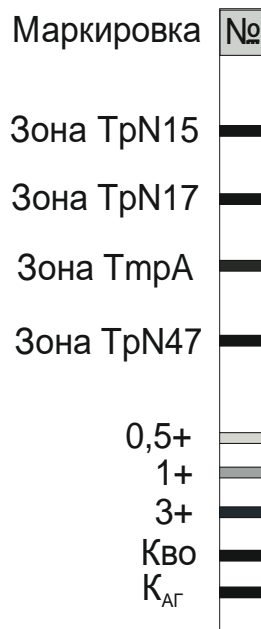


Рис. 1. Стандартна схема нанесення антигенів *Treponema pallidum* та контролей на стрип

В кожний комплект поставки входять також планшети пластмасові з канавками – 3 шт. (по 8 канавок), клейка плівка для планшетів – 3 шт., пінцет пластиковий – 1 шт.

Компоненти набору упаковані в коробку, в коробку вкладені інструкція з використання та стандартний протокол обліку результатів.

### ОСНОВНІ СПОЖИВЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Обидва базові варіанти комплектації набору дозволяють одномоментне дослідження 24 зразків, включно з контрольними ( на контрольні зразки використовується 2 стрипи). Передбачена можливість проведення окремих досліджень з використанням необхідної кількості стрипів. При цьому допускається дослідження контрольних зразків тільки в першій постановці після відкриття набору.

### ПРИНЦИП ДІЇ

При наявності в досліджуваному зразку до *Treponema pallidum* вони зв'язуються з антигенами імуносорбента, комплекси, що утворилися антиген-антитіло зв'язуються з кон'югатом – козячими антитілами до IgG людини, міченими лужною фосфатазою, та виявляються за колірною реакцією з хромогеном, яка призводить до появи у відповідних зонах стрипа забарвлених смуг, інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту антитіл в досліджуваній пробі.

### АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діагностична чутливість до *Treponema pallidum* – 100 %.

Діагностична специфічність – 97,5%.

### ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Нативна сироватка (плазма) крові або спинномозкова рідина людини об'ємом не менше 20 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 низькій. Допускається тільки одноразове заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки перед використанням 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 мстять осад, перед аналізом відцентрифугувати 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

#### Обладнання і матеріали

Центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, папір фільтрувальний, вода дистильована, ручні або автоматичні промивачі, або восьми- та дванадцяти каналні піпеточні дозатори для промивання лунок планшета, мірні стакани або циліндри місткістю від 25 до 500 мл, насос вакуумний, автоматичний гойдаючий пристрій (20-60 коливань за хвилину), пінцет для роботи зі стрипами (пластмасовий або металевий).

## Приготування робочих розчинів реагентів для ИФА

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 (ПР)

При використанні системи для автоматизації імунного блотингу або при одночасному використанні всіх стрипів в "ручній" постановці вміст флакона з ПР(х10) перелити в мірну ємність (місткістю 500 мл) та водою очищеною довести об'єм рідини до позначки, ретельно перемішати.

При дробовій "ручній" постановці відібрати необхідний об'єм ПР(х10), довести до заданого об'єму водою очищеною, ретельно перемішати, об'єми ПР(х10) та води, необхідні для постановки з використанням різної кількості стрипів, приведені в табл. 1.

Таблиця 1

Кількість стрипів	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
ПР(х10), мл	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
Вода очищена, до ...мл	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440

*Примітка.* При використанні кількості стрипів, не вказаної в таблиці, необхідні об'єми реагентів визначати, виходячи з розрахунку 1 мл ПР(х10) і до 10 мл води очищеної на 1 стрип.

Готовий розчин зберігати при температурі від 18 до 25 °С не більше 48 год; при температурі від 2 до 8 °С – не більше 14 діб.

### Приготування робочого розведення кон'югата (для комплекта № 1)

Готувати безпосередньо перед використанням.

При використанні системи для автоматизації імунного блотингу або при одночасному використанні всіх стрипів в "ручній" постановці відібрати 0,9 мл кон'югата та перенести у флакон, що містить РРК (45 мл).

При дробовій "ручній" постановці необхідний об'єм РРК внести в чисту ємність і додати необхідний об'єм кон'югата; ретельно перемішати (об'єми кон'югата і РРК, необхідні для постановки з використанням різної кількості стрипів, приведені в табл. 2).

Таблиця 2

Кількість стрипів	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
РРК, мл	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Кон'югат, мкл	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440

*Примітка.* При використанні кількості стрипів, не вказаної в таблиці, необхідні об'єми реагентів визначати, виходячи з розрахунку 1 мл РРК і 20 мкл кон'югата на 1 стрип.

Візуальним контролем внесення кон'югата в РРК є зміна забарвлення розчину з рожевою на бузкову.

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

### Приготування інших реагентів

Імуносорбент,  $K^+$ ,  $K^-$ , РРЗ, кон'югат (в комплекті № 2), РРК (в комплекті № 1), СР – готові до використання. Розчини перед використанням обов'язково перемішати обережним страхуванням флаконів.

Після відкриття упаковок невикористані реагенти (крім імуносорбента) зберігати в щільно закритій упаковці при температурі від 2 до 8 °С до того як термін придатності спливе.

## Проведення аналізу

### Ручна постановка

1. Підготувати необхідну кількість планшетів. Відкрити пробірку зі стрипами. Необхідну кількість стрипів (один стрип на кожний використовуваний і контрольний зразок) обережно по одному витягти з контейнера пінцетом і помістити в канавки планшета (планшетів) маркованою стороною вгору. Щільно закрити контейнер з невикористаними стрипами та помістити його для наступного зберігання при температурі від 2 до 8 °С не більше 6 мес.

2. В канавки планшета (планшетів) зі стрипами внести по 1 мл РРЗ, витримати 3-5 хв при струшуванні на шейк ері при швидкості качання платформи 20-60 об/хв при температурі від 18 до 25 °С

*Увага!* Слідкуйте, щоб при інкубаціях і відмивках були повністю занурені в рідину, а реагенти задля уникнення змішування не переливати через бортики канавок.

3. Окремими наконечниками внести по 20 мкл контрольних ( $K^+$  і  $K^-$ ) та досліджуваних зразків.

*Увага!* Внесення зразків має супроводжуватися швидким перемішуванням автоматичною піпеткою. При внесенні кожного (досліджуваного та контрольного) зразка необхідно реєструвати номер відповідного йому стрипа.

4. Заклеїти зайняті доріжки клейкою плівкою або закрити кришкою. Помістити планшет на шейкер. Інкубувати 2 год при швидкості качання платформи 20-60 об/хв при температурі від 18 до 25 °С.

5. Не пізніше, ніж за 5-10 хв до закінчення інкубації приготувати робочий промивний розчин (див.п. Приготування робочого промивного розчину).

6. Після інкубації видалити рідину з канавок планшета, використовуючи автоматичну піпетку або вакуумний насос, в ємність, що містить дезінфікуючий розчин.

*Увага!* Слід поводитися обережно, щоб при видаленні розчинів з канавки не випав стрип. Наконечник відсмоктує чого пристрою після кожного контакту з різними зразками слід промити дистильованою водою або використати для кожного зразка окремий одноразовий наконечник задля уникнення перехресної контамінації. Слідкуйте, щоб краплі вологи не залишалися під стрипом. При необхідності обережно підніміть стрип пінцетом і видаліть з-під нього залишки вологи.

7. Промити кожен стрип 4 рази робочим промивним розчином, вносячи в канавку по 2 мл розчину.

При першій промивці розчин видалити з лунки, як вказано в п. 6, одразу після внесення.

При наступних трьох промивках після внесення промивного розчину витримати планшет по 5 хв на шейкері при швидкості качання платформи 20-60 об/хв. Видалення промивного розчину проводити, як вказано в п.6.

8. В усі використані канавки планшета внести 1,0 мл робочого розведення кон'югата (для комплекта № 1) або кон'югата, готового до вживання (для комплекта № 2).

9. Інкубувати протягом 30 хв при температурі від 18 до 25 °С на шейкері при швидкості качання платформи 20-60 об/хв.

10. Після інкубації видалити рідину з канавок планшета, як вказано в п. 6. Промити стрипи, як вказано в п.7.

*Увага! Промивку і видалення рідини після реакції з кон'югатом виконуйте особливо акуратно, бо навіть сліди кон'югата при контакті з хромогеном можуть призвести до неспецифічного забарвлення всього стрипа, а не окремих смуг.*

11. Внести в усі використані канавки по 1,0 мл субстратного розчину. Інкубувати 10-15 хв на шейкері при швидкості качання платформи 20-60 об/хв в захищеному від світла місці при температурі від 18 до 25°C до появи на стрипі забарвлених смуг.

12. Для зупинки реакції видалити субстратний розчин, як вказано в п. 6.

Промити стрипи 4 рази, вносячи в канавки по 2 мл води очищеної і витримуючи планшет по 1 хв на шейкері при швидкості качання платформи 20-60 об/хв. Воду видалити, як вказано в п. 6.

13. Помістити стрипи між двома листами фільтрованого паперу маркованою стороною вгору і витримати в захищеному від світла місці до повного висихання, після чого одразу ж зареєструвати результати.

### Регістрація і облік результатів.

Регістрацію проводять візуально, порівнюючи інтенсивність забарвлення антигенних ліній з інтенсивністю забарвлення контрольних ліній по табл. 3.

Таблиця 3

Інтенсивність забарвлення антигенних ліній	Оцінка
Забарвлення відсутнє або менш інтенсивне, ніж "0,5+"	-
Інтенсивність забарвлення рівна "0,5+"	0,5+
Інтенсивність забарвлення вище, ніж "0,5+", але нижче або рівна "1+"	1+
Інтенсивність забарвлення вище, ніж "1+", але нижче, ніж "3+"	2+
Інтенсивність забарвлення рівна "3+"	3+
Інтенсивність забарвлення вище, ніж "3+"	4+

Результати, отримані на стрипах з досліджуваними зразками, враховувати тільки при дотриманні наступних умов:

- контрольна лінія внесення зразка ( $K_{BO}$ ) забарвлена;
- контрольна лінія специфічності реакції ( $K_{AG}$ ) не забарвлена;
- добре розрізняванні контрольні лінії інтенсивності забарвлення з чіткою їх диференціацією (контрольна лінія "3+" забарвлена інтенсивніше, ніж лінія "1+"; а лінія "1+" забарвлена інтенсивніше, ніж лінія "0,5+");
- забарвлення контрольних зразків відповідає табл. 4.

Таблиця 4

Зразок	Забарвлення лінії					
	TrN15	TrN17	TrpA	TrN47	$K_{BO}$	$K_{AG}$
$K^-$	-	-	-	-	+	-
$K^+$	не нижче "0,5+"	не нижче "1+"	не нижче "1+"	не нижче "1+"	+	-

Якщо дані умови не дотримуються, дослідження необхідно повторити.

Забарвлення смужки контролю специфічності реакції Окрашивание ( $K_{AG}$ ) означає, що зразок дає неспецифічну реакцію (через наявність великої кількості антитіл до бактеріальних антигенів або внаслідок недотримання правил приготування і зберігання сироваток). В цьому разі повторне дослідження необхідно проводити зі знову отриманим зразком.

### Інтерпретація результатів

Для оптимального обліку результатів проявлені стрипи рекомендується прикріпити до протоколу так, щоб контрольні лінії інтенсивності 3+ у всіх стрипів і відповідна лінія на малюнку протокола були на одному рівні. В цьому випадку проявлені антигенні смуги будуть знаходитися на рівні смуг відповідних антигенів на малюнку протоколу. Для закріплення стрипів на протоколі можна використовувати смужки із захисної плівки на планшет, якими комплектується набір.

При дотриманні вищеперерахованих умов інтерпретувати результати, отримані на стрипах з досліджуваними зразками, використовуючи табл. 5.

Таблиця 5

Наявність та інтенсивність антигенних смуг на стрипів	Результат дослідження
Нема забарвлених смуг або є лише одна смуга з інтенсивністю забарвлення, рівній "0,5+"	Негативний
Є лише одна смуга з інтенсивністю забарвлення, не меншій за "1+"	Невизначений
Є не менше двох смужок з інтенсивністю забарвлення, не меншій за "0,5+"	Позитивний

При отриманні невизначеного результату рекомендується провести повторне дослідження; якщо в ньому знову буде отриманий невизначений результат, рекомендується взяття крові через 3-4 тижні з проведенням нового дослідження на виявлення антитіл до антигенів *Treponema pallidum*.

**Постановка з використанням систем для автоматизації імуноблотинга**

Підготувати прилад згідно з інструкцією з його експлуатації, ввести програму аналізу, відповідну використуваному 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  
(Сифіліс-Блот-БЕСТ)**

<b>Внести</b>	В канавки планшета по одному стрипу для кожного контрольного та досліджуваного зразка; в кожна канавку – по 1 мл РРЗ
<b>Інкубація</b>	3-5 хв, 18-25 °С, на шейкері (20-60 об/хв)
<b>Внести</b>	по 20 мл контрольних та досліджуваних зразків
<b>Інкубація</b>	2 год, 18-25 °С, на шейкері (20-60 об/хв)
<b>Промити</b>	4 рази ПР
<b>Внести</b>	В кожна канавку по 1,0 мл робочого розведення кон'югата (для комплекта № 1) або кон'югата (для комплекта № 2)
<b>Інкубація</b>	30 хв, 18-25 °С, на шейкері(20-60 об/хв)
<b>Промити</b>	4 рази ПР
<b>Внести</b>	В кожна канавку по 1,0 мл СР
<b>Інкубація</b>	10-15 хв, 18-25 °С, на шейкері (20-60 об/хв)
<b>Промити</b>	4 рази водою очищеною
Висушити стрипи між листів фільтрувального паперу і зареєструвати	