

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО *TRYPONEMA PALLIDUM*, ПЕРША ВЕРСІЯ ULTRA

Syphilis Ab One Version ULTRA

Кат. № : **SIAB1ULTRA.CE**

Дата випуску інструкції: **2019/11**
Версія: **5**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Імуноферментний аналіз для визначення антитіл до *Трепонема Pallidum* у сироватці та плазмі

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Ферментний імуноаналіз (ІФА) для одноетапного якісного визначення антитіл (IgG, IgM та IgA) до *Трепонема Pallidum*.

Набір призначений для скринінгу одиниць крові та спостереження Тр-інфікованими пацієнтами. Тільки для діагностики in vitro.

В. ВСТУП

Сифіліс - це захворювання, що передається статевим шляхом, викликане *Трепонема pallidum* або Тр, бактерією сімейства Spirochaetaceae. Тр є грамнегативним і вважається суворо анаеробним, демонструючи характерну рухливість через периплазматичні джгутики. Клітинна стінка і цитоплазматична мембрана оточують вміст цитоплазми.

Сифіліс - це складне гостре хронічне інфекційне захворювання з різноманітними клінічними проявами залежно від стадії інфекції та індивідуальної реакції. Інкубаційний період коливається від 10 днів до 3 місяців, а антитіла зазвичай виявляються через 2-4 тижні від первинного ураження.

У минулому було розроблено багато аналізів для імунологічного виявлення інфекції *T.pallidum* (VDRL, TRHA, RPR), які все ще використовуються в діагностичній лабораторії.

Нещодавно методи ІФА були застосовані для скринінгу на антитіла до сифілісу в банках крові та інфекційних відділеннях, що дозволяє клініцистам використовувати автоматичні інструменти для аналізу та записи оптичного зчитування.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті очищеними синтетичними антигенами *Трепонема pallidum* (p15, p17 і p47).

Сироватку/плазму пацієнта додають у мікролульку разом із сумішшю синтетичних антигенів Тр, мічених пероксидазою (HRP).

Специфічний імунокомплекс, що утворюється в присутності анти-Тр Ab в зразку, захоплюється твердою фазою.

Наприкінці одноетапної інкубації мікролульки промивають для видалення нез'язаних білків сироватки та HRP кон'югату.

Потім додають хромоген/субстрат і в присутності захопленого імунокомплексу безбарвний субстрат гідролізують зв'язаним HRP кон'югатом до забарвленого кінцевого продукту. Після блокування ферментативної реакції, її оптичну щільність вимірюють ІФА-зчитувачем. Інтенсивність кольору пропорційна кількості антитіл до Тр, присутніх у зразку.

Версія ULTRA підходить для автоматизованих скринінгів.

Д. КОМПОНЕНТИ

Стандартна конфігурація набору містить достатню кількість реагентів для проведення 192 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

2 мікропланшети. 12 смужок по 8 відривних лунок. Мікропланшети покриті очищеними синтетичними антигенами *Трепонема pallidum* (p15, p17 і p47).

Планшети запаковані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакет з осушувачем і зберігайте при 4°C (°C).

2. Негативний контроль CONTROL -

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Містить 50% сироватку кози, 0.2 М Трис буфер, 0.09% азиду нбатрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Кодований жовтим кольором.

3. Позитивний контроль CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Містить інактивовану сироватку людини, позитивну до Тр, 5% BSA, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4+/-0.1, 0.09 азид натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Кодований зеленим кольором.

4. Калібратор: CAL...

2 флакони. Ліофілізований калібратор. Містить інактивовані антитіла до Тр, калібровані відповідно до 1^{го} Міжнародного Стандарту ВООЗ для людської сифілітичної плазми IgG та IgM NIBSC Код: 05/132, 4% бичачий сироватковий альбумін, 2% манітол, 50 мМ (mM) трис-буфер pH 7.8, 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину і 0.045% ProClin 300.

Примітка: Об'єм необхідний для розчинення вмісту флакону може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний обсяг, зазначений на етикетці.

5. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

2x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин, що містить 0.045% ProClin 300 в якості консерванту. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буферний фізіологічний розчин pH 7.0+/-0.2 і 0.05% Твін 20.

6. Ферментний кон'югат: CONJ

1 x 25.0 мл/пляшку (ml/bottle). Розчин готовий до використання. Він містить синтетичні антигени Тр, марковані HRP, Трис буфер доповнений 0.045% ProClin 300, Твін 20 і BSA. Кодування червоним кольором.

7. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x25 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання компонент. Містить 50 мМ (mM) цитратний буфер pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетраметилбензидин або ТМБ і 0.02% перекис водню або H₂O₂.

Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці, оскільки чутливі до сильного освітлення.

8. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M

1x25 мл/пляшка (ml/bottle). Містить 0.3 М розчину H₂SO₄.
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

9. Уцільнювальна фольга для планшета 4 шт.

10. Вкладиш інструкції 1 шт.

Важлива примітка: Тільки за спеціальним запитом Dia.Pro може надати реагенти для 96, 480, 960 тестів, як зазначено нижче:

К-стестів	96	480	960
Код	SIAB1ULTRA.CE.96	SIAB1ULTRA.CE.480	SIAB1ULTRA.CE.960
1. Мікропланшет	1	5	10
2. Негативний контроль	1 x 2.0 мл/флакон	1 x 10 мл/флакон	1 x 20 мл/флакон
3. Позитивний контроль	1 x 2.0 мл/флакон	1 x 10 мл/флакон	1 x 20 мл/флакон
4. Калібратор	1 флакон	5 флаконів	10 флаконів
5. Концентрат буферу для промивання	1 x 60 мл/флакон	5 x 60 мл/флакон	4x150мл/пляшку
6. Ферментний кон'югат	1 x 16 мл/флакон	2 x 40 мл/флакон	4x40 мл/флакон
7. Хром./Субстрат	1 x 16 мл/флакон	2 x 40 мл/флакон	4x40мл/флакон
8. Сірчана кислота	1 x 15 мл/флакон	2 x 40 мл/флакон	2 x 80 мл/флакон
9. Герметична плівка	2	10	20
10. Інструкція	1	1	1

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки 100 мкл (μl) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревинним вугіллям, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 45 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +37 °C (°C).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.

- Якщо набір використовується для скринінгу одиниць крові та компонентів крові, він повинен використовуватися в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я або аналогічним органом) для проведення цього типу аналізу.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без талку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
- Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не надавайте Хромоген/Субстрат дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
- Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
- Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
- Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
- Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв (min).
- Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
- Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

- Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.

- Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату, даючи помилково негативні результати.
- Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
- Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
- Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 ° ... + 8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
- Якщо присутні частинки, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшети:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став зеленим, що вказує на дефект консервації.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°-8°C (°C). Після першого відкриття невикористані смужки стабільні доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

Негативний та позитивний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Калібратор:

Додайте до ліофілізованого порошку об'єм води класу ELISA, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: калібратор після розчинення не стабільний. Зберігати в замороженому вигляді в аликвотах при -20°C (°C).

Концентрат Промивного буфера:

Весь вміст концентрованого розчину необхідно розбавити 20x бідистильованою водою і обережно перемішати від кінця до кінця перед використанням. Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів промивання.

Примітка: після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2...8°C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішати на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімічними речовинами, пилом або мікробами. Якщо цей компонент необхідно перенести, використовуйте тільки пластикові та, якщо можливо, стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами. Не надавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **Н-фрази**:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **Р-фрази**:

R280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

R302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

R332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

R305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

R337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

R362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

І. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.

2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.

3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід праймувати розведеним Промивним Розчином.

Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M NaOH).

5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μl/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками.

Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.

4. Час інкубації має допуск ± 5%.

5. Зчитувач ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускання здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.

6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання.

Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.

7. При використанні автоматичних пристроїв, якщо тримач для флаконів інструменту не підходить до флаконів, що входять до набору, перелійте розчин у відповідні контейнери та промаркуйте їх такою ж етикеткою, яка була відірвана від оригінального флакону.

Ця операція важлива для уникнення невідповідності вмісту флаконів під час їх перенесення. Після закінчення тестування, поверніть вторинні марковані контейнери до температури 2..8°C, і, щоб вони були щільно закриті.

8. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

І. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розчиніть Калібратор як описано вище.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім перемішайте як описано.
6. Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
7. Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
8. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
9. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
10. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
11. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

М. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Автоматизований метод проведення аналізу:

Якщо використовується автоматична робоча станція, спочатку переконайтеся, що прилад перевірений згідно пункту І.б. Потім встановіть ту саму процедуру, що й у ручному аналізі відповідно до роботи автоматичної робочої станції.

Проведення аналізу вручну:

1. Розмістіть необхідну кількість лунок у тримачі. Решту лунок зберігати в пакеті разом з осушувачем при 2..8°C (°C). Залишіть лунку А1 порожньою для бланкування.
2. Потім внесіть 100 мкл (μl) Негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (μl) Калібратора у двох примірниках та 100 мкл (μl) Позитивного контролю одноразово у відповідні лунки, а потім по 100 мкл (μl) кожного зразка. Не розводити Контролі та Калібратор, оскільки вони вже розведені та готові до використання!
Перевірте наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця в кольорі між порожньою і повною лункою) або зчитуванням при 450/620 нм (nm). (зразки показують значення ОЩ вище 0.100).
3. Додайте 100 мкл (Ферментний кон'югат у всі лунки, окрім А1, що використовується для бланкування.

Важлива примітка:

1. *Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі кон'югату. Може відбутися забруднення.*
2. *Смужки повинні бути заклені клейкою герметизуючою фольгою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.*

- Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 45 хв.**
- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомляється у розділі 1.3.
- Внесіть 100 мкл (μl) суміші ТМВ/Н₂О₂ у кожен лунку, включаючи бланк-лунку. Перевірте чи правильно доданий реагент.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **15 хвилин при кімнатній температурі (18 -24°C (°C)).**

Важлива примітка: не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти в кожен лунку, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 6. Додавання кислоти перетворить позитивні контролю та позитивні зразки з синього кольору на жовтий/коричневий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі 1.5, за допомогою зчитувача мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону), бланкуючи інструмент на А1 (обов'язково).

Важливі зауваження:

Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Контролі та Калібратор (*)	100 мкл (μl)
Зразки	100 мкл (μl)
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
1-а інкубація	45 хв
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
2-а інкубація	15 хв
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

(*) Важливі примітки:

- (*) Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-off, тому він не впливає на обчислення результатів тестування.
- (*) Калібратор (CAL) використовується тільки в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2											
B	NC	S3											
C	NC	S4											
D	NC	S5											
E	CAL (*)	S6											
F	CAL (*)	S7											
G	PC	S8											
H	S1	S9											

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний Контроль
CAL (*) = Калібратор – необов'язковий PC = Позитивний контроль
S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка контролю проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення ОЩ450 нм (nm) очікувані та зазначені в таблиці нижче.

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.050 значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	< 0.200 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування
Позитивний контроль (PC)	>1.000 значення ОЩ 450 нм (nm)

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі та виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка >0.050 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль (NC) >0.200 ОЩ450 нм (nm) після бланкування	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтвержені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний миючий розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного контролю замість негативного контролю); 4. що жодного забруднення негативного контролю або лунок, куди був доданий контроль, не відбулося через позитивні зразки, розлив або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
Позитивний контроль <0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали негативний контроль замість позитивного. У такому разі, негативний контроль становитиме ОЩ450 нм (nm) > 0.150, також); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла будь-яка з перерахованих вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

**** Примітка:**

Якщо використовується Калібратор, перевірте наступні дані:

Перевірка	Вимоги
Калібратор (CAL)	S/Co > 1.1

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, то слід діяти наступним чином:

Проблема	Перевірка
Калібратор S/Co < 1	1. що процедура проведена правильно; 2. що під час дистрибуції не допущено жодної помилки (напр. додали негативний контроль замість калібратора); 3. що процедура миття та налаштування вошера перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, Негативний контроль, Позитивний контроль) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань обчислюють за допомогою граничного значення cut-off, визначеного за такою формулою для середнього значення ОЩ450 нм (nm) негативного контролю (NC):

$$NC + 0.200 = \text{Cut-off (Co)}$$

Значення, знайдене для тесту, використовується для інтерпретації результатів, як описано в наступному параграфі.

Важлива примітка: Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для обчислення граничної величини cut-off та отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення ОЩ450 нм (nm) зразка та значення cut-off (або S/Co), відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 0.9	Негативний
0.9 – 1.1	Сумнівний
> 1.1	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт не був заражений *Treponema Pallidum* або, що одиницю крові можна переливати.

Будь-якого пацієнта, який показує сумнівний результат, слід повторно перевірити на іншому зразку, взятому через 1-2 тижні від пацієнта та дослідити. Не слід переливати одиницю крові.

Позитивний результат вказує на інфекцію Тр, тому пацієнта слід лікувати відповідним чином або утилізувати одиницю крові.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Будь-який позитивний результат повинен бути підтверджений альтернативним методом, здатним виявити антитіла до Тр (ТРНА, VDRL), до того, як буде сформульовано діагноз Тр-інфекції.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагностику Тр-інфекції має проводити і передавати пацієнту тільки кваліфікований лікар.

Приклад обчислення показаний нижче:

Наведені нижче дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний контроль: 0.038 – 0.040 – 0.039 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.039 ОЩ450 нм (nm)

Нижче, ніж 0.200 – Прийнято

Позитивний Контроль: 2.589 ОЩ450 нм (nm)

Вище, ніж 1.000 – Прийнято

Cut-off = 0.080 + 0.200 = 0.280

Калібратор: 1.030 – 1.036 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 1.033 ОЩ450 нм (nm) S/Co > 1 = 3.7

S/Co вище, ніж 1.1 – Прийнято

Зразок 1: 0.070 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 2: 1.690 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 1 S/Co < 0.9 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1.1 = позитивний

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності була проведена відповідно до того, що повідомляється у внутрішніх технічних специфікаціях та відповідно до Центрів контролю та профілактики захворювань, що передаються статевим шляхом, 2002 року.

R1. АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ:

Межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для IgG та IgM сифілітичної плазми людини, код NIBSC: 05/132.

У таблиці нижче наведено результати, отримані для цього матеріалу з трьома партіями продуктів.

ВООЗ розводили в негативному контролі та досліджували в 4 повторах.

ВООЗ 1-й міжнар. стд. МО/мл (IU/ml)	SIAB1ULTRA.CE Лот 1 ОЩ450 нм (nm)	SIAB1ULTRA.CE Лот 2 ОЩ450 нм (nm)
0.01	0.889	0.903
0.005	0.487	0.521
0.0025	0.275	0.320
0.00125	0.168	0.225
Нег. контроль	0.015	0.009

Продукт SIAB1ULTRA.CE показує аналітичну чутливість краще ніж 0.0025 МО/мл (IU/ml).

R2. ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ:

Оцінка продуктивності пристрою була проведена в ході випробування, проведеного на більш, ніж 200 позитивних зразках і понад 2000 негативних зразках.

R2.1 Діагностична специфічність:

Визначається як ймовірність негативного результату аналізу за відсутності конкретного аналіту.

На додаток до першого дослідження, де було досліджено загалом більше 2000 зразків, включаючи невідібраних донорів, госпіталізованих пацієнтів і потенційно перехресні зразки, нещодавно оцінили діагностичну специфічність шляхом тестування загалом 1204 негативних зразків на трьох різних партіях. Знайдено значення специфічності 100%. Як плазму, отриману з використанням різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку, також було перевірено, щоб перекопатися, що під час підготовки зразка немає перешкод.

Заморожені зразки також були перевірені на предмет перешкод під час забору та зберігання.

Не спостерігалось жодних перешкод, якщо зразок прозорий, без частинок і не забруднений.

R2.2 Діагностична чутливість:

Визначається як ймовірність позитивного результату аналізу в присутності конкретного аналіту. Діагностична чутливість була оцінена у внутрішній оцінці ефективності на загальній кількості понад 200 зразків, отриманих від інфекції Тр.

Додатково оцінювали діагностичну чутливість:

- Код панелі PSS 901, наданий Seracare;
- Дві панелі європейського походження, виробництва EFS, Франція, на основі зразків європейського походження: партія № 08.150830, партія № 09/171002
- Кваліфікаційна панель для боротьби з сифілісом QSS701 від Seracare
- Позитивний контроль BBI Diagnostics Accurun 156 Reagin (Syphilis) від Seracare

проти набору з маркуванням CE, який вже є на ринку.

Була виявлена діагностична чутливість 100%.

R3. ТОЧНІСТЬ:

Негативний контроль (NC), калібратор (CAL) і позитивний контроль (PC) пристрою були досліджені в 16 повторах протягом трьох запусків (всього n = 48) на трьох різних партіях продукту.

Розраховано коефіцієнти варіації (% CV).

З отриманих значень ОЩ450 нм (nm) були отримані такі середні значення:

	NC	CAL	PC
ОЩ450 нм (nm)	0.030	1.138	3.319
CV	0.005	0.072	0.086
КВ%	14.3	6.4	2.6

Варіабельність, показана в таблиці, не призводить до будь-якої неправильної інтерпретації, зокрема зразка, закритого для діагностичного порогу аналізу.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Повторювані хибнопозитивні результати, не підтверджені методом Вестерн-блот або подібними методами, оцінювалися як менш, ніж 0.1% від нормальної популяції.

Помічено, що заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину після розморожування, дають помилкові результати.

ЛІТЕРАТУРА

1. Zhonghua yi xue za zhi 87:24 2007 Jun 26 pg 1721-2 Wang LN, Zheng HY, Li J, Wang XF, Liu XR Sensitivity and specificity of ELISA based on recombinant Treponema pallidum antigen and rapid plasma reagin test in diagnosis of syphilis: a comparative study.
2. Dermatol Clin. 1998 Oct;16(4):691-8.Syphilis. Serology. Young H.
3. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against Treponema pallidum. Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Exposto Fda L. J Clin Microbiol. 2003 Jan; 41(1):250-3.
4. Are Treponema pallidum Specific Rapid and Point-of-Care Tests for Syphilis Accurate Enough for Screening in Resource Limited Settings? Evidence from a Meta-Analysis. Jafari Y, Peeling RW, Shivkumar S, Claessens C, Joseph L, Pai NP. PLoS One. 2013; 8(2):e54695. Epub 2013 Feb 26.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила ISO 13485. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

