

Затверджено
Заступник головного державного санітарного
лікаря України
21 квітня 2005 р.

ІНСТРУКЦІЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

DIA-IgG-IgM-Trep тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класів IgG та IgM до *Treponema pallidum*

Набір T1-12

T-2307C

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність антитіл класів IgG та IgM до *Treponema pallidum* методом імуноферментного аналізу.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Тест-система являє собою набір, що включає наступні компоненти: *імуносорбент* – полістироловий планшет, в лунках якого сорбовані рекомбінантні білки Trp 15, Trp 17, Trp 41 та Trp 47 – аналоги антигенів *Treponema pallidum*; *концентрат кон'югату* – суміш моноклональних антитіл до імуноглобулінів класів IgG та IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому; *позитивний контроль* – очищені імуноглобуліни людини, специфічні до *Treponema pallidum*; *негативний контроль* – інактивована сироватка крові людини, яка не містить антитіла до *Treponema pallidum*, а також поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та антитіла до ВІЛ і вірусу гепатиту С; *концентрат розчину для промивання* – концентрат фосфатно-сольового буферу, містить детергент; *розчини для розведення сироваток та кон'югату* – фосфатно-сольові буфери, що містять детергент, казеїнову фракцію білків молока, блок-компоненти, барвник і консерванти; *субстратний буфер* – цитратно-фосфатний буфер, що містить перекис водню; *хромоген* – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в розчині; *стоп-реагент* – розчин сірчаної кислоти.

Зовнішній вигляд компонентів: *імуносорбент* – планшет, що складається з 12 стрипів по 8 лунок з можливістю відокремлення кожної лунки; *концентрат кон'югату* – червона з незначною опалесценцією рідина; *позитивний та негативний контроль* – світло-жовті з незначною опалесценцією рідини; *концентрат розчину для промивання* – безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при нагріванні; *розчин для розведення сироваток* – фіолетова опалесцююча рідина; *розчин для розведення кон'югату* – червона опалесцююча рідина; *субстратний буфер, розчин ТМБ, стоп-реагент* – прозорі безбарвні рідини.

Тест-система розрахована на проведення 96 аналізів, включаючи контроль, з можливістю використання планшета постріпово або використання частини стрипу на 12 постановок імуноферментного аналізу (12×8).

Принцип аналізу

Принцип аналізу DIA-IgG-IgM-Trep базується на методі твердофазного непрямого ІФА.

При внесенні в лунки зразків досліджуваних сироваток антитіла класів IgG та IgM, специфічні до *Treponema pallidum*, у випадку їх наявності зв'язуються з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою кон'югату. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (при довжині хвилі 450 нм), яка пропорційна концентрації специфічних до *Treponema pallidum* антитіл у зразках сироваток або плазми крові.

СКЛАД НАБОРУ

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	1 планшет (12×8)
2	Концентрат кон'югату (11x)	1 амп. × 1,5 мл
3	Позитивний контроль	1 амп. × 0,7 мл
4	Негативний контроль	1 амп. × 1,0 мл
5	Концентрат розчину для промивання (46x)	2 фл. × 25 мл
6	Розчин для розведення сироваток	1 фл. × 15 мл
7	Розчин для розведення кон'югату	1 фл. × 15 мл
8	Субстратний буфер	1 фл. × 8 мл
9	Розчин ТМБ	1 фл. × 8 мл
10	Сторп-реагент	1 фл. × 15 мл
11	Клейка плівка	3 шт.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°C;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Вимоги до промивання планшету:

- неякісне промивання планшету призводить до одержання некоректних результатів;
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові зберігають при температурі 2-8°C не більше 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°C) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

Проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 8 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°C протягом 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 4 мл розчину і розводять в 180 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогривають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 10 діб.

1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 1 мл розчину для розведення кон'югату та додають 100 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.3 Приготування розчину ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 0,5 мл хромогену ТМБ і додають 0,5 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно захищати від попадання прямого світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

2 Проведення аналізу

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.
- Звільняють необхідну кількість стрипів від упаковки, вставляють їх в рамку.

Невикористані стрипи необхідно щільно закрити в пакеті та використати протягом одного місяця. Невикористані стрипи зберігають при температурі 2-8 °С.

- В лунки вносять по 80 мкл розчину для розведення сироваток.
- Додають в лунки по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).
- В дві лунки (А1-В1) вносять 20 мкл позитивного контролю, а в три лунки (С1-Е1) по 20 мкл негативного контролю.

Обережно піпетують суміш в лунках (під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках).

- Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату згідно п. 1.2.
- В лунки вносять по 100 мкл розчину кон'югату.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 30 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.3.
- Вносять в лунки по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують його при температурі 18-25 °С в темному місці протягом 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
- Не більше як через 5 хвилин після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

ОГ можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в планшеті при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

- Розраховують середнє значення оптичної густини для лунок негативного контролю (ОГсер К-) та позитивного контролю (ОГсер К+).
- Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГсер К- не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), а ОГсер К+ не нижче 0,6 ОО.
- Якщо одне з трьох значень ОГ К- більше 0,1 ОО, або більше ніж в два рази перевищує ОГсер К-, його відкидають і ОГсер К- розраховують за рештою значень ОГ К-.
- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину **0,12** до значення ОГсер К-.
- "Сіра зона" - зона значень ОГ, від ГЗ до значень ОГ менших ГЗ на 10%.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше нижнього рівня ОГ "сірої зони".
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.
- Зразки, які мають значення ОГ в межах "сірої зони" вважаються **невизначеними**.
- Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не менш ніж в двох лунках тест-системи:
 - зразки позитивні в одній або більше лунках слід вважати позитивними;
 - зразки негативні в двох або більше лунках слід вважати негативними.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8°C. Заморожувати набір не дозволяється.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору – 1 рік 2 місяці.

ФОРМА ВИПУСКУ – тест-набір.

Код АТС – V04CX.

ПАКУВАННЯ

- Імуносорбент вкладений в пакет з багатшарової та комбінованої плівки; пакет термозапаяний.
- Кон'югат, позитивний контроль, негативний контроль розлиті в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.
- Розчини, крім розчину ТМБ, розлиті у пластмасові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.
- Розчин ТМБ розлитий у флакони з пластмаси коричневого кольору об'ємом 15 мл.
- Набір компонентів разом з інструкцією з використання поміщений в коробку з гофрокартону з пластиковою вставкою.

ВИРОБНИК

АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“, 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицького, 35.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 або e-mail: tech@diapr.kiev.ua.

Рекламації на якість наборів надсилайте до ДП "Центр імунобіологічних препаратів" за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.