

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО TREPONEMA PALLIDUM

## SYPH IgM

Кат. № : **SIM.CE**

Дата випуску інструкції: **2019/11**  
Версія: **3**



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

### Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення IgM антитіл до Трепонема Pallidum у сироватці та плазмі

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

#### А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Ферментний імуноаналіз (ІФА) для визначення IgM антитіл до *Treponema Pallidum* (Тр) у плазмі та сироватці людини.

Набір призначений для спостереження за Тр-інфікованими пацієнтами. Тільки для діагностики in vitro.

#### В. ВСТУП

Сифіліс - це захворювання, що передається статевим шляхом, викликане *Treponema 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 імунодомінантними синтетичними антигенами Тр (рекомбінантними р47, р17 і ТррА).

Під час 1-ї інкубації твердої фази обробляють розведеними зразками і IgM до Тр захоплюють, якщо є, антигенами.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації виявляються зв'язані анти-Тр IgM шляхом додавання антитіла до hIgM, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл анти-Тр IgM, присутніх у зразку.

Таким чином, наявність IgM у зразку можна визначити за допомогою граничного значення, здатного розрізнити негативні та позитивні зразки.

Нейтралізація анти-Тр IgG, що проводиться безпосередньо в лунці, виконується в аналізі, щоб блокувати перешкоди, викликані цим класом антитіл, при визначенні IgM.

#### Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для проведення 96 тестів.

##### 1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок x 8 мікролунок, покритих синтетичними Тр-специфічними антигенами (реср47, реср17 та ресрТррА). 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. Містить антитіла IgM людини, негативні до Тр, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер рН 6.0 +/- 0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

Негативний контроль має блідо-жовтий колір.

##### 3. Позитивний контроль CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Він містить високий титр антитіл IgM людини, позитивних до Тр, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

Позитивний контроль має зелено- жовтий колір.

##### 4. Калібратор: CAL...

1 флакон. Ліофілізований реагент розчиняють водою класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить білки бичачої сироватки, низький титр людських IgM антитіл до Тр, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцин-сульфату та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

**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

1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буферний фізіологічний розчин рН 7.0+/-0.2 і 0.05% Твін 20 та 0.045% Proclin 300.

##### 6. Ферментний кон'югат : CONJ

1 x 16 мл/флакон (ml/vial). Розчин готовий до використання та кодується червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgM людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер рН 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин-сульфат як консерванти.

##### 7. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитрат-фосфатний буфер рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетраметилбензидин або ТМБ і 0.02% перекис водню або H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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

##### 8. Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

##### 9. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

##### 10. Нейтралізуючий реагент: SOLN NEUT

1x8 мл/флакон (ml/vial). Містить козячий анти hIgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

##### 11. Ущільнювальна фольга для планшета 2 шт.

##### 12. Вкладиш інструкції 1 шт.

#### Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000, 100 та 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації), оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби.
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (+/- 0.5 °C (°C) допустиме відхилення).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

## Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку 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 біомедицині лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. 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 (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до шести 6 використанням пристрою та до 3 місяців.
11. 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 біомедицині лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. 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).
14. 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.
15. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. 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.

## Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. 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.

2. 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.
3. 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 відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. 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 виїняті 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.
5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об/хв протягом 20 хв або фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.

## Н. 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 зберігання.

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 контроль:

Готові до використання компоненти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

### Позитивний контроль:

Готові до використання компоненти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

### Калібратор:

Додайте до ліофілизованого 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 20х бідистильованою водою і обережно перемішати зверху донизу 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.

#### **Розчинник для зразка:**

Готовий до використання компонент. Перед використанням обережно перемішати на вортексі.

#### **Нейтралізуючий реагент:**

Готовий до використання компонент. Перед використанням обережно перемішати на вортексі.

#### **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:**

**P280** - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

**P302+P352** - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

**P332+P313** - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

**P305+P351+P338** - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

**P337+P313** - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

**P362+P363** - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

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

- 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.
- 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.
- 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.
- Час інкубації має допуск ± 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 (а) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (б) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (с) лінійність до ≥ 2.0; (д) 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.
- 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.

- 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.

#### **L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ**

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- 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 пролило рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розчиніть Калібратор як описано.
- Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі усі рідкі реагенти.
- 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.
- Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
- Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

#### **M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ**

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

- Розведіть зразки 1:101 у відповідно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Контролі/Калібратор, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Земістіть необхідну кількість Мікролунок у тримачі. Залишіть лунку A1 порожньою для бланкування.
- Додайте 50 мкл (μl) Нейтралізуючого реагенту в усі лунки, окрім A1, яка призначена для бланкування та у лунки, що використовуються для Контролів та Калібратора.

**Важлива примітка:** Нейтралізуючий реагент здатний блокувати хибнопозитивні реакції через РФ. Позитивні зразки у внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були позитивні за допомогою IVD, який не здійснює жодної реакції блокування РФ.

- Потім внесіть 100 мкл (μl) Негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (μl) Позитивного контролю в одному примірнику, 100 мкл (μl) Калібратора у двох примірниках та 100 мкл (μl) розведених зразків у відповідні лунки.
- Інкубувати планшет протягом 60 хв при +37°C (°C).

**Важлива примітка:** Смужки повинні бути заклеєні клейкою герметизуючою фольгою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомляється у розділі І.3.
- Внесіть 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату у кожен лунку, окрім А1, та накрийте герметичною плівкою. Перевірте, щоб цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, крім А1.

**Важлива примітка:** Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубувати мікропланшет протягом 60 хв при +37°C (°C).
- Промити мікролунки як на етапі 6.
- Внесіть 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожен лунку, включаючи бланк-лунку. Потім інкубуйте мікропланшет протягом 20 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 10. Додавання кислоти перетворить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього кольору на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою зчитувача мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи інструмент на А1.

#### Загальні 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
Нейтралізуючий реагент (тільки для зразків)	50 мкл (μl)
Контролі та Калібратор (*)	100 мкл (μl)
Розведені зразки 1:101	100 мкл (μl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	100 мкл (μl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>20 хв</b>
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 валідації здійснюється на контролях і калібраторі щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу відповідають очікуванням.

Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль	< 0.150 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації <30%
Позитивний контроль	ОЩ 450 нм (nm) >0.500

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

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

Проблема	Перевірка
<b>Бланк-лунка</b> >0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
<b>Негативний контроль (NC)</b> >0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування  Коефіцієнт варіації >30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтверджені 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); 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
<b>Позитивний контроль</b> <0.500 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний контроль); 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.

#### \*\* Важлива примітка:

Якщо використовується Калібратор, перевірте наступні дані:

Перевірка	Вимоги
Калібратор (CAL)	S/Co > 1.0

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

Проблема	Перевірка
<b>Калібратор</b>  S/Co < 1.0	1. що процедура проведена правильно; 2. що під час дистрибуції не допущено жодної помилки (напр. додали негативний контроль); 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. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, результати розраховують із середнього значення ОЩ450 нм (nm) негативного контролю (NC) за допомогою граничного значення cut-off (Co), визначеного за такою формулою:

$$\text{Cut-off} = \text{NC} + 0.250$$

**Важлива примітка:** Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

## Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

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

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
1.0 – 1.2	Сумнівний
> 1.2	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що у пацієнта немає антитіл IgM до *Treponema Pallidum*.

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

Позитивний результат вказує на інфекцію Тр, тому пацієнта слід лікувати відповідним чином.

### Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- 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 медичний лікар.

Приклад обчислення показаний нижче:

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

Негативний контроль: 0.100 – 0.120 – 0.080 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.100 ОЩ450 нм (nm)

Нижче, ніж 0.150 – Прийнято

Позитивний Контроль: 1.000 ОЩ450 нм (nm)

Вище, ніж 0.500 – Прийнято

$$\text{Cut-off} = 0.100 + 0.250 = 0.350$$

Калібратор: 0.500 – 0.540 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.520 ОЩ450 нм (nm)

S/Co вище, ніж 1.0 – Прийнято

Зразок 1: 0.080 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 2: 1.800 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 1 S/Co < 1.0 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1.2 = позитивний

## R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності була проведена на вибраних панелях, проведених у клінічному зовнішньому центрі.

### 1. Межа виявлення:

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл Тр IgM.

За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий від пацієнта з гострою інфекцією ТР в анамнезі, щоб забезпечити постійну та хорошу чутливість пристрою.

### 2. Діагностична чутливість та специфічність:

Діагностичні показники оцінювалися в дослідженні оцінки ефективності, проведеному у зовнішньому клінічному центрі з чудовим досвідом діагностики інфекційних захворювань (лікарня 12 жовтня, відділення мікробіології, Мадрид, Іспанія).

Діагностична чутливість була досліджена на більш, ніж 50 зразках, попередньо отриманих позитивними результатами за допомогою стандартного набору FDA США. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією Тр інфекції.

Діагностична специфічність була визначена на панелях із понад 200 негативних зразків від нормальних людей і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, що потенційно інтерферують.

Також було досліджено панель потенційно інтерферуючих зразків (RF+, гемолізовані, ліпемічні тощо). На досліджуваних зразках ніяких інтерференцій не виявлено.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту. На чистих зразках і зразках без частинок не спостерігалось жодних інтерференцій. Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість:	> 98%
Специфічність:	> 98%

### 3. Відтворюваність:

Була розрахована за трьома зразками, дослідженими у повторах у різних запусках. Значення КВ, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках різної реактивності Тр IgM, досліджених у 16 повтореннях у трьох окремих запусках, становили 4-16%, залежно від значень ОЩ450 нм.

Показана мінливість не призвела до неправильної класифікації зразка.

### 5. ОБМЕЖЕННЯ

Помилкова позитивність була оцінена менше, ніж у 2% нормальної популяції, в основному через високі титри РФ. Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибнопозитивні результати.

### ЛІТЕРАТУРА

- Coffe E. et al.. (1980) Serological Tests for syphilis. In Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Jaffe H.W. et al.. (1978) Arch.Intern.Med. 138: 252-255
- Jaffe H.W. et al.. (1978) Am.J.Clin.Pathol. 70: 230-233
- Mattews H.M. et al.. (1979) Infect.Immun. 24: 713-719
- Shore R.N. et al.. (1974) Arch.Dermatol.109: 854-857
- Sparling P.F. (1971) N.Engl.J.Med. 284: 642-653
- Rupli T. (1989) Dermatologica 179: 113-117
- Rolf T.R. et al.. (1990) JAMA 264: 1432-1437

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](mailto: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](mailto: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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

