

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО *TREPONEMA PALLIDUM*, ПЕРША ВЕРСІЯ ULTRA

## Syphilis Ab One Version ULTRA

Кат. №: **SIAB1ULTRA.CE.480**

Дата випуску інструкції: **11-2019**

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 *Treponema Pallidum* у сироватці та плазмі

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

#### А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення антитіл (IgG, IgM та IgA) до *Treponema Pallidum*.

Набір призначений для скринінгу одиниць крові та спостереження за хворими на сифіліс. Тільки для діагностики «in vitro».

#### В. ВСТУП

Сифіліс - це захворювання, що передається статевим шляхом, спричинене *Treponema Pallidum* або Тр, бактерією, що належить до сімейства *Spirochaetaceae*. Тр є грамнегативним і вважається суворо анаеробом, проявляючи характерну рухливість завдяки периплазматичним джутикам. Клітинна стінка та цитоплазматична мембрана закривають цитоплазматичний вміст.

Сифіліс - це складне, гостре, хронічне інфекційне захворювання з різними клінічними проявами, залежно від стадії зараження та індивідуальної реакції. Період інкубації коливається від 10 днів до 3 місяців, і 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 досі використовуються в діагностичній лабораторії.

Наразі, методи ІФА застосовуються для скринінгу антитіл на сифіліс у банках крові та інфекційних відділеннях, що дозволяє клініцистам використовувати автоматичні прилади аналізу та записи оптичного зчитування.

#### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті очищеними синтетичними антигенами *Treponema Pallidum* (p15, p17 та p47).

Тверду фазу спочатку обробляють зразком і антитіла анти-Тр захоплюються, якщо вони є, антигенами, нанесеними в мікропланшеті.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у другій інкубації зв'язані анти-Тр загальні антитіла виявляються додаванням синтетичних антигенів Тр, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл анти-Тр, присутніх у зразку. Після блокування ферментативної реакції її оптичну щільність вимірюють за допомогою зчитувача ІФА.

Версія ULTRA особливо підходить для автоматизованих скринінгів.

#### Д. КОМПОНЕНТИ

Стандартна конфігурація містить реagentи для проведення 192 тестів і складається з наступних компонентів:

##### 1. Мікропланшет MICROPLATE

2 мікропланшети. 12 смужок по 8 мікролунок. Мікропланшети покриті очищеними синтетичними антигенами *Treponema Pallidum* (p15, p17 та p47).

Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Дайте мікропланшету досягти кімнатної температури перед відкриванням; повторно запечатайте невикористані смужки в мішку з осушувачем і зберігайте при температурі 4 °C (°C).

##### 2. Негативний контроль CONTROL -

1x4.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить 5% BSA, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4 +/- 0.1, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Кодується жовтим кольором.

##### 3. Позитивний контроль CONTROL +

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

##### 4. Калібратор CAL ....мл (ml)

2 флакони. Ліофілізований калібратор. Містить інактивовані антитіла Тр, відкалібровані на основі 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для сифілітичної плазми крові IgG та IgM NIBSC, код: 05/132, 4% бичачого сироваткового альбуміну, 2% манітолу, 50 мМ (mM) трис-буфера pH 7.8, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300.

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

##### 5. Концентрат промивного буфера WASHBUF 20X

2x60 мл (мл)/пляшка. 20X концентрований розчин, що містить 0.045% ProClin 300 як консервант. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2 та 0.05% Tween 20.

##### 6. Ферментний кон'югат CONJ

1x25.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання розчин. Він містить синтетичні антигени Тр, мічені HRP, буфер Tris, доповнений 0.045% ProClin 300, Tween 20 та BSA. Кодується червоним кольором.

##### 7. Хромоген/Субстрат SUBS TMB

1x25 мл (мл)/пляшка. Готовий до використання компонент. Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатного буфера, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетра-метил-бензидину або TMB та 0.02% перекису водню або H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.**

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

1x25 мл (мл)/пляшка. Містить 0.3 M (M) розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Примітка: Увага: Подрозносяча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

##### 9. Ущільнювальна фольга для планшета x 4 шт.

##### 10. Вкладиш інструкції

#### Важлива примітка:

Тільки за конкретним запитом Dia.Pro може поставити реagentи для 96, 480, 960 тестів, як повідомляється нижче:

Кількість тестів	96	480	960
Код	SIAB1ULTRA.CE.96	SIAB1ULTRA.CE.480	SIAB1ULTRA.CE.960
1. Мікропланшети	x 1	x 5	x 10
2. Негативний контроль	1x2.0 мл (мл)/фл.	1x10 мл (мл)/фл.	1x20 мл (мл)/фл.
3. Позитивний контроль	1x2.0 мл (мл)/фл.	1x10 мл (мл)/фл.	1x20 мл (мл)/фл.
4. Калібратор	x 1 фл.	x 5 фл.	x 10 фл.
5. Концентрат Промивного буфера	1x60 мл (мл)/фл.	5x60 мл (мл)/фл.	4x150 мл (мл)/фл.
6. Ферментний кон'югат	1x16 мл (мл)/фл.	2x40 мл (мл)/фл.	4x40 мл (мл)/фл.
7. Хромоген/Субстрат	1x16 мл (мл)/фл.	2x40 мл (мл)/фл.	4x40 мл (мл)/фл.
8. Сірчана кислота	1x15 мл (мл)/фл.	2x40 мл (мл)/фл.	2x80 мл (мл)/фл.
9. Ущільнювальна фольга для планшета	x 2	x 10	x 20
10. Вкладиш інструкції	x 1	x 1	x 1

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

- Калібровані мікропіпетки (100 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 45 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.

5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або мокрий), здатний забезпечити температуру +37 °С (°C).
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.

#### **F. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові та компонентів крові, він повинен використовуватися в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерство охорони здоров'я або аналогічний орган) для проведення такого типу аналізу.
3. 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.
4. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
5. 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.
6. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °С (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
7. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
8. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
9. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
11. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
12. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись 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.
13. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
14. Відходи, що утворились 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 °С (°C) протягом 20 хв.
15. 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.
16. 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**

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. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату, даючи помилково негативні результати.
3. 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.
4. 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 викидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при +2-8 °С (°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 °С (°C) декілька місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
6. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хв або фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8μ, щоб очистити зразок для тестування.

#### **H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ**

##### **Мікропланшети:**

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro.

Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при +2-8 °С (°C).

При першому відкритті смужки, що залишилися, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не перетвориться з жовтого на зелений.

##### **Негативний та Позитивний контролі:**

Готові до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

##### **Калібратор:**

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

**Примітка:** Розчин не є стабільним. Зберігайте калібратор у замороженому вигляді в аліквотах при -20 °С (°C).

##### **Концентрат Промивного буфера:**

Весь вміст концентрованого розчину перед використанням слід розбавити 20X бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

**Примітка:** Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2-8 °С (°C).

##### **Ферментний кон'югат:**

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами. Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову та, якщо можливо, стерильну одноразову тару.

## Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

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

## Сірчана кислота:

Готовий 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.

**P302+P352** - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКИРУ: 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.

## I. 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%.
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 інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл (μl)/лунку 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 мікропланшетів 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) пропускна 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.
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 розділах «Валідація тесту» та «Технічні характеристики». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений на повну відповідність заявленим характеристикам набору. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок через сильно реагуючі зразки, що призводить до хибнопозитивних результатів. Для скринінгу крові рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

7. При використанні автоматичних пристроїв, якщо тримач пробірки приладу не підходить до пробірок, що входять до набору, перелийте розчин у відповідні контейнери та позначте їх тим самим ярликом, відклеєним від оригінального флакона. Ця операція важлива, щоб уникнути невідповідності вмісту флаконів при їх передачі. Після закінчення тесту поверніть контейнери із вторинним маркуванням до температури +2-8 °C (°C), щільно закупоривши.
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.

## L. 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 поломки і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть все вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розведіть Калібратор, як описано вище.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім перемішайте, як описано.
6. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
7. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
8. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте 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.

## 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.

Процедуру аналізу можна виконати з однаковими показниками, дотримуючись двох протоколів часу інкубації.

Виберіть той, який вимагається офіційними правилами вашої країни або лабораторії:

1. Тривала інкубація (1-а інкубація 60 хвилин, 2-а та 3-я інкубації 30 хвилин).
2. Коротка інкубація (1, 2 інкубації 45 хвилин та 3 інкубація 15 хвилин).

## Автоматизований аналіз:

Якщо використовується автоматична робоча станція, спочатку переконайтеся, що прилад перевірено згідно з пунктом I.6.

Потім встановіть ту саму процедуру, що і в ручному аналізі, відповідно до роботи автоматичної робочої станції.

### 1. Тривала інкубація - ручний аналіз:

1. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Інші смужки зберігайте у мішку з осушувачем при температурі +2-8 °C (°C), закритими. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
2. Внесіть 100 мкл (µl) Негативного контролю у трьох примірниках, 100 мкл (µl) Калібратора у двох примірниках та 100 мкл (µl) Позитивного контролю в одному примірнику в окремі лунки, після чого по 100 мкл (µl) кожного зразка. Не розбавляйте Контролі та Калібратор, оскільки вони попередньо розведені, готові до використання! Перевірте наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця кольорів між порожніми та повними лунками) або шляхом зчитування при 450/620 нм (nm) (Зразки показують значення OD вище 0.100).

#### Важлива примітка:

**Смужки слід заклеювати клейкою герметичною фольгою лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.**

3. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хв при температурі +37 °C**.
4. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як зазначено у розділі І.3.
5. Піпетуйте 100 мл (ml) Ферментного Кон'югату у кожну лунку, крім першої лунки для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей червоний компонент розподілений у всі лунки, крім А1.

#### Важливі примітки:

**Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунки наконечником піпетки, коли дозується кон'югат. Може статися забруднення.**

6. Інкубуйте мікропланшет протягом **30 хв при +37 °C (°C)**.
7. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 4.
8. Піпетуйте 100 мкл (µl) суміші ТМВ/Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> у кожну лунку, включаючи бланк-лунку. Перевірте, чи правильно додано реагент.
9. Інкубуйте мікропланшет протягом **30 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °C (°C))**.

**Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може створюватися високий фон.**

10. Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 8, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю та позитивних зразків з блакитного на жовтий/коричневий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці А1.

### 2. Коротка інкубація - ручний аналіз:

1. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Інші смужки зберігайте у мішку з осушувачем при температурі +2-8 °C (°C), закритими. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
2. Внесіть 100 мкл (µl) Негативного контролю у трьох примірниках, 100 мкл (µl) Калібратора у двох примірниках та 100 мкл (µl) Позитивного контролю в одному примірнику в окремі лунки, після чого по 100 мкл (µl) кожного зразка. Не розбавляйте Контролі та Калібратор, оскільки вони попередньо розведені, готові до використання! Перевірте наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця кольорів між порожніми та повними лунками) або шляхом зчитування при 450/620 нм (nm) (Зразки показують значення OD вище 0.100).

#### Важлива примітка:

**Смужки слід заклеювати клейкою герметичною фольгою лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.**

3. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хв при температурі +37 °C (°C)**.
4. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як зазначено у розділі І.3.
5. Піпетуйте 100 мл (ml) Ферментного Кон'югату у кожну лунку, крім першої лунки для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей червоний компонент розподілений у всі лунки, крім А1.

#### Важливі примітки:

**Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунки наконечником піпетки, коли дозується кон'югат. Може статися забруднення.**

6. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хв при +37 °C (°C)**.
7. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 4.
8. Піпетуйте 100 мкл (µl) суміші ТМВ/Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> у кожну лунку, включаючи бланк-лунку. Перевірте, чи правильно додано реагент.
9. Інкубуйте мікропланшет протягом **15 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °C (°C))**.

**Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може створюватися високий фон.**

10. Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 8, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю та позитивних зразків з блакитного на жовтий/коричневий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці А1.

#### Важливі загальні 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 (Тривала інкубація)	Операції (Коротка інкубація)
Контролі&Калібратори*	100 мкл (µl)	100 мкл (µl)
Зразки	100 мкл (µl)	100 мкл (µl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>60 хв.</b>	<b>45 хв.</b>
Температура	+37 °C (°C)	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)	100 мкл (µl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>30 хв.</b>	<b>45 хв.</b>
Температура	+37 °C (°C)	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	100 мкл (µl)	100 мкл (µl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>30 хв.</b>	<b>15 хв.</b>
Температура	КТ	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (µl)	100 мкл (µl)
Зчитування ОЦ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

#### Важливі примітки:

**Результати аналізів не змінюються через різні протоколи інкубації.**

- (\*) Калібратор (CAL) не впливає на обчислення значення cut-off, отже, він не впливає на обчислення результатів тесту.

- (\*) Калібратор (CAL) застосовується лише в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього лабораторного контролю якості.

Нижче 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 PC = Позитивний Контроль S = Зразок CAL(\*) = Калібратор, не обов'язково

## О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Будь-коли, коли використовується набір, перевіряються контролю, щоб визначити, чи відповідають значення OD450 нм (nm) очікуваним і вказаним в таблиці нижче.

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.050 значення OD 450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	< 0.200 середнього значення OD 450 нм (nm) після бланкування
Позитивний контроль	> 1.000 значення OD 450 нм (nm)

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
<b>Бланк-лунка</b> > 0.050 значення OD 450 нм (nm)	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не забруднився під час аналізу
<b>Негативний контроль (NC)</b> > 0.200 середнього значення OD 450 нм (nm) після бланкування	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер заповнений ним; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного контролю замість негативного); 4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
<b>Позитивний контроль</b> < 1.000 значення OD 450 нм (nm)	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення негативного контролю замість позитивного контролю. У цьому випадку негативний контроль матиме значення OD 450 нм (nm) > 0.150 також); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулось зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем, повідомте про цю проблему керівнику для подальших дій.

## \*\* Примітка:

Якщо калібратор використовувався, перевірте такі дані:

Перевірити	Вимоги
Калібратор (CAL)	S/Co > 1.1

Якщо результати тесту не відповідають вимогам, зазначеним вище, виконайте такі дії:

Проблема	Перевірити
<b>Калібратор</b> S/Co < 1.1	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час його внесення не сталася помилка (напр.: внесення негативного контролю замість калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулось зовнішнє забруднення калібратора.

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

## P. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань обчислюють за допомогою значення cut-off, визначеного за такою формулою для середнього значення OD 450 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.

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

## Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 нм (nm) зразка та значення cut-off (або S/Co), згідно з наступною таблицею:

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

**Негативний результат** вказує на те, що пацієнт не інфікований *Treponema Pallidum* або що кров може бути перелита.

Будь-який пацієнт, що має **неоднозначний результат**, повинен бути повторно перевірений на іншому зразку, взятому через 1-2 тижні після первинного зразка; кров не слід переливати.

**Позитивний результат** свідчить про інфікування Tr і тому пацієнт повинен отримати відповідне лікування або кров повинна бути утилізована.

## 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 виявляти антитіла до Tr (TRHA, VDRL), перш ніж формулювати діагноз Tr-інфекції.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз Tr-інфекції повинен встановлювати та передавати пацієнту кваліфікований лікар.

Нижче наведено приклад розрахунку:

Не слід використовувати наведені нижче дані замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний контроль: 0.039 - 0.040 - 0.039 OD 450 нм (nm)  
Середнє значення: 0.039 OD 450 нм (nm)  
Менше 0.200 - Прийнято

Позитивний контроль: 2.589 OD 450 нм (nm)  
Вище ніж 1.000 - Прийнято  
Cut-Off = 0.080 + 0.200 = 0.280

Калібратор: 1.030 - 1.036 OD 450 нм (nm)  
Середнє значення: 1.033 OD 450 нм (nm) S/Co = 3.7  
S/Co вище 1.1 - Прийнято

Зразок 1: 0.070 OD 450 нм (nm)  
Зразок 2: 1.690 OD 450 нм (nm)  
Зразок 1 S/Co < 0.9 = негативний  
Зразок 2 S/Co > 1.1 = позитивний

## Р. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка результатів була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях та відповідно до Центрів контролю та профілактики захворювань, що передаються статевим шляхом, 2002.

Ефективність аналізу широко вивчалася з використанням двох різних протоколів (Тривалого та Короткого), що дало еквівалентні результати.

### 1. Аналітична чутливість

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

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

Матеріал ВООЗ розбавляли в Негативному контролі та досліджували у 4 повторях.

1-й міжнародний стандарт ВООЗ МО/мл (IU/ml)	SIAB1ULTRA.CE Лот 0313 OD 450 нм (nm)	SIAB1ULTRA.CE Лот 0313/2 OD 450 нм (nm)	SIAB1ULTRA.CE Лот 0313/3 OD 450 нм (nm)
0.01	1.149	1.240	1.046
0.005	0.576	0.574	0.506
0.0025	0.298	0.275	0.241
0.00125	0.141	0.143	0.123
Негативний контроль	0.016	0.017	0.024

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

### 2. Діагностична специфічність і чутливість

Оцінка продуктивності пристрою була проведена в ході випробувань, проведених на більш ніж 200 позитивних зразках та понад 2000 негативних зразках.

#### 2.1 Діагностична специфічність

Визначається як ймовірність аналізу отримати негативний результат за відсутності конкретного аналіту.

На додаток до першого дослідження, де було обстежено 2000 зразків, включаючи невивраних донорів, госпіталізованих пацієнтів та зразки, що потенційно перехресно реагують, нещодавно була оцінена діагностична специфічність, протестувавши загалом 2150 негативних зразків в чотирьох різних партіях. Виявлене значення специфічності становить 100%.

Як плазму, отриману з використанням різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки також перевіряли, щоб з'ясувати, чи немає інтерференції через підготовку зразка.

Заморожені зразки також були протестовані для перевірки на наявність інтерференції через збір та зберігання.

Ніяких інтерференцій не спостерігалося, якщо зразок прозорий, без частинок і не забруднений.

### 2.2 Діагностична чутливість

Визначається як ймовірність аналізу давати позитивний результат в присутності конкретного аналіту.

Діагностичну чутливість оцінювали у внутрішній Оцінці Продуктивності на загальній кількості понад 200 зразків, що надходять від Тр-інфекції.

Діагностичну чутливість додатково оцінювали на:

- Панелі, код PSS 202 (M), що постачається BBI, США;
- Двох панелях європейського походження, вироблених EFS, Франція, на основі зразків європейського походження: лот № 08.150830, лот № 09/171002;
- Панелі кваліфікації сифілісу QSS701, поставленої компанією Seracare;
- Позитивному контролю BBI Diagnostics Accurun 156 Reagin (сифіліс), що постачається компанією Seracare проти набору з маркуванням CE, який уже присутній на ринку. Була виявлена діагностична чутливість 100%.

### 3. Точність

Негативний контроль (NC), Калібратор (CAL) та Позитивний контроль (PC) пристрою досліджували у 16 повтореннях за три прогони (загальна кількість n = 48) на трьох різних партіях продукту.

Розраховували коефіцієнти варіації (% CV).

З отриманих значень OD 450 нм (nm) були отримані наступні середні значення:

	NC	CAL	PC
OD 450 нм (nm)	0.033	0.790	2.649
Стандартне відхилення SD	0.004	0.034	0.159
CV%	13.2	4.7	5.8

Варіабельність, показана в таблиці, не призводить до будь-якого неправильного тлумачення, зокрема зразка, близького до діагностичного порогу аналізу.

### 5. ОБМЕЖЕННЯ

Повторювані помилково позитивні результати, не підтвержені Western Blot або подібними методами підтвердження, оцінювали як менше 0.1% від нормальної популяції.

Спостерігалося, що заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину після розморожування, дають деякі хибні 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 піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



**ВИРОБНИК**

ТОВ ДІА.ПРО Діагностік Біопробс  
вул. Г. Кардуччі, 27  
20099 Сесто Сан Джованні  
Мілан 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)

