



Vitrotest[®]

Vitrotest Anti-Treponema

Імуноферментна тест-система для виявлення
антитіл до *Treponema pallidum*

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK023

«Vitrotest Anti-Treponema»

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до *Treponema pallidum*

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Anti-Treponema» призначена для виявлення антитіл класів IgG та IgM до *Treponema pallidum* у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

Сифіліс – широко розповсюджене інфекційне захворювання, викликане збудником *Treponema pallidum*. Хвороба характеризується пошкодженнями шкіри, слизових оболонок, внутрішніх органів, кісток та нервової системи. Це системна інфекція, за якої періоди активних проявів хвороби чергуються з прихованими періодами.

Першими після інфікування *T.pallidum* утворюються специфічні антитіла класу IgM, що реєструються з другого тижня після зараження та досягають найвищого рівня в крові на 6-9 тижні. На четвертому тижні після зараження організм починає синтезувати специфічні антитіла класу IgG (період первинного серопозитивного сифілісу). Після успішно проведеного лікування кількість антитіл класу IgG у крові поступово знижується, але в деяких осіб, що переохворіли на сифіліс, імуноглобуліни цього класу можуть зберігатися тривалий час та виявлятися чутливими серологічними методами.

До серологічних методів діагностики сифілісу належать реакція Вассермана, реакція мікропреципітації та її аналоги – VDRL-тест, RPR-тест, реакція гемаглютинації, та найбільш чутливий тест – імуноферментний аналіз.

На сьогоднішній день в імуноферментних тест-системах для діагностики сифілісу використовуються рекомбінантні антигени - аналоги ліпопротеїнів *T.pallidum* з молекулярними масами 15, 17, 41-45 та 47 кДа (p15, p17, TmpA та p47).

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл специфічних до *T.pallidum* в тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках рекомбінантними антигенами *T.pallidum*. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до *T.pallidum* антитіл з антигенами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається суміш кон'югатів антивидових (анти-IgG та анти-IgM) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язуються з імуноними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імуноних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імуноні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими рекомбінантними антигенами *T.pallidum*.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,7 мл розчину імуноглобулінів людини, специфічних до *T.pallidum* з консервантами (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 1,8 мл негативної сироватки крові людини з консервантом (жовтий).

Розчин для розведення сироваток РРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (коричнево-зелений).

Розчин кон'югату РК – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину суміші пероксидазних кон'югатів моноклональних антитіл до IgG та IgM людини, із стабілізаторами та консервантом (зелений). Готовий до використання.

Розчин для промивання Tr100 (20x) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Тритоном X100 (безбарвний).

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Клейка плівка – 2 аркуша плівки для заклеювання планшетів під час інкубації

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2} *Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.*

5. Застереження та техніка безпеки

5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

Примітка: Допускається використання Розчину для промивання Tr100 (20X), Розчину ТМБ та Стоп-реагенту інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

– після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

– чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

– під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

– кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

– уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;

– розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

- для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;

– ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2. Техніка безпеки:

– всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;

– постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

– не піпетувати розчини ротом;

– позитивним контролем тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» є інактивована прогріванням сироватка крові людини, що містить антитіла до T.pallidum, в якій не виявлено HBsAg та антитіл до ВІЛ ½ та вірусу гепатиту С, однак працювати із контролем слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

– негативний контроль тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» протестовано та знайдено негативним на HBsAg та антитіла до ВІЛ ½, ВГС, *Treponema pallidum*, однак поводитись із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклауйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6%-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реактиви тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, за умови зберігання їх при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. Внести в усі лунки планшета по 80 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37°C.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.13. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО);
- ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,1 ОО;
- оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,30, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,30$$

Розрахувати «сіру зону» значень ОГ, що знаходиться до 10 % нижче від граничного значення тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema», тобто

$$0,9 \times ГЗ \leq Сіра зона \leq ГЗ$$

10.3. Інтерпретація результатів

Зразки із значенням оптичної густини нижче «сірої зони» значень ОГ вважаються **негативними** в тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema».

Досліджувані зразки в межах «сірої зони» значень ОГ вважати **невизначеними**. Такі сироватки слід дослідити повторно в двох лунках тест-системи.

Зразки із значенням ОГ вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema». Після повторного тестування **позитивними** в тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema» вважаються зразки, ОГ котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні ОГ зразка в обох повторах була нижче граничного значення таку сироватку вважати негативною.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Діагностичні характеристики тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» оцінювали на комерційній панелі сироваток, які містять та не містять антитіла до *Treponema pallidum* – „П-Ат-Т.pallidum” (МБС, Росія). Ця панель складається з 16 зразків, які містять антитіла до *T.pallidum* та 8 зразків, які не містять антитіл до *T.pallidum*. На даній панелі чутливість та специфічність тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» становили 100%.

Діагностичну інформативність тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» також оцінювали на комерційній панелі сироваток «Anti-T.pallidum Mixed Titer Performance Panel PHV201» виробництва SeraCare Company (США), яка складається з охарактеризованих зразків сироваток та плазми, які містять та не містять антитіла до *T.pallidum*. В тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema» всі позитивні та негативні зразки визначались коректно, відповідно до паспортних даних.

Також специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest Anti-Treponema» оцінювали на панелі охарактеризованих сироваток, що складається з 32 зразків сироваток та плазми крові людини позитивних в реакції Вассермана та реакції мікропреципітації. В тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema» всі сироватки були визначені позитивними. При дослідженні специфічності тест-набору «Vitrotest Anti-Treponema» з використанням 254 сироваток, негативних на антитіла до *Treponema pallidum* всі 254 зразки були виявлені негативними.

11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (*Intra assay reproducibility*)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ОГ середня	CV ₁ , %	CV ₂ , %
12	0,718	5,7	5,2
24	1,940	4,7	4,8

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (*Inter assay reproducibility*)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ОГ середня	CV, %
12	0,778	8,0
24	2,082	5,1

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Anti-Трепонема» є свідченням наявності у пацієнта антитіл специфічних до *Treponema pallidum*, які продукуються організмом при інфікуванні *T.pallidum*.

Негативний результат в тест-системі «Vitrotest Anti-Трепонема» показує, що тестований зразок не містить антитіл до збудника сифілісу *Treponema pallidum*, або концентрація специфічних антитіл нижче межі чутливості аналізу.

Остаточний діагноз може бути встановлено лише з урахуванням клінічних проявів та даних комплексу лабораторних досліджень.

Література

1. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса, ч. I. // Вестник дерматовенерологии. – 1996. – № 2. – С. 29-32.
2. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса, ч. II. // Вестник дерматовенерологии. – 1996. – № 3. – С. 33-38.
3. Young H. Syphilis: serology. // Dermatologic Clinics.–1998. – V. 16, № 4. – P. 691-698.
4. Larsen S., Steiner B., Rudolf A. Laboratory diagnosis and interpretation of test for syphilis. // Clinical Microbiology Reviews – 1995. –V. 8, № 1. – P. 1-21.
5. Castro R., Prieto E., Santo I et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for the detection of antibodies against *Treponema pallidum* // Journal of clinical microbiology, Jan. 2003, p. 250–253.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання Tr100 очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль, B1, C1 та D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest Anti-Treponema» за формулою:

$$ГЗ = ОГ_{K-середнє} + 0,30$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення оптичної густини

$ОГ_{зразка} > ГЗ$

$0,9 \times ГЗ \leq ОГ_{зразка} \leq ГЗ$

$ОГ_{зразка} < 0,9 ГЗ$

Результат

позитивний

невизначений

негативний
