

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы иммуноферментной для выявления суммарных антител к *Treponema pallidum*

### "ИФА-анти-Lues-рек"

An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total antibodies to *Treponema pallidum* ("EIA anti-Lues-rec")

96 определений

### Принцип метода

Метод основан на одновременном связывании антител, присутствующих в тестируемом образце, с комплексом рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*, сорбированных на поверхности лунок планшета и комплексом тех же антигенов, конъюгированных с ферментом пероксидазой хрена (конъюгат). Далее, после добавления субстрата и хромогена (ТМБ), в ходе ферментативной реакции происходит конверсия окраски ТМБ – раствор приобретает синий цвет, а после остановки реакции стоп-реагентом – желтый. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию в образце антител к *Treponema pallidum*.

Нетто-время проведения анализа – 1,5 часа (1 час – 30 мин). Предварительное разведение образцов не требуется.

### Назначение

Тест-система предназначена для выявления суммарных антител (IgG, IgM, IgA) к возбудителю сифилиса в сыворотке или плазме крови человека. Рекомендуется для скрининга крови доноров и использования в качестве составной части комплекса серологических реакций при диагностике сифилиса.

### Комплектация

1. Планшет, сорбированный рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum* - 1 шт.
2. Отмывочный раствор – фосфатный буфер, содержит Tween-20, **25-кратный концентрат** - 28 мл
3. Конъюгат (комплекс антигенов *Trep. pallidum* конъюгир. с пероксидазой хрена), **11-кратный концентрат** - 0,75 мл
4. Раствор для разведения конъюгата – фосфатный буфер со стабилизаторами - 7,5 мл
5. Положительная контрольная сыворотка (К+) - 0,7 мл
6. Отрицательная контрольная сыворотка (К-) - 1,4 мл
7. ТМБ - раствор 3,3',5,5'- тетраметилбензидина в субстратном буфере - 15 мл
8. Стоп-реагент - 15 мл      Заклейка для планшета - 1 шт

#### Необходимые материалы, не входящие в состав набора:

Одноканальные микропипетки на 50-100 мкл и 1 мл	Ванночки для реагентов
Восьмиканальная микропипетка на 50-100 мкл	Термостат на 37° С
Фотометр для 96-луночных планшет с фильтром 450 нм	Дистиллированная вода
Автоматический промыватель для планшетов или восьмиканальная микропипетка на 250 - 300 мкл	

### Условия хранения и транспортирования

Тест-систему хранить в сухом месте при +2 - +8°С. Транспортирование осуществляют всеми видами крытого транспорта при тех же условиях. Допускается транспортирование при температуре до +25°С в течение не более трех суток. Замораживание не допускается.

Срок годности указан для реагентов до их вскрытия при хранении при +2 - +8°С.

Срок годности после вскрытия: конъюгат, контрольные сыворотки и планшет (в плотно закрытом пакете с поглотителем влаги) - 3 месяца при +2 - +8° С ; остальные реагенты – в соответствии с датой срока годности, указанной на упаковке. Хранение при +2 - +8°С.

### Рекомендации и предупреждения

1. Использовать только для диагностики *in vitro*.
2. Перед использованием тест-системы необходимо внимательно изучить данную инструкцию и строго соблюдать изложенные в ней требования. Производитель не несет ответственности за последствия, вызванные возможной некорректной работой тест-системы в случае несоблюдения требований инструкции.
3. Использовать только компоненты, входящие в состав набора.
4. Для каждого реагента должны быть использованы новые наконечники для пипеток.
5. Используйте только те количества реагентов, которые необходимы для данной постановки реакции. Оставшиеся неиспользованными растворы категорически запрещается переливать обратно во флаконы с исходными реагентами.
6. ТМБ чувствителен к свету. Необходимо также исключить контакт этого раствора с окислителями, такими, как хлорсодержащие моющие средства и металлы.
7. Несмотря на то, что лунки микропланшета покрыты рекомбинантным антигенами, а контрольные сыворотки в наборах являются отрицательными на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С и вирусу иммунодефицита человека, они, так же как и тестируемые образцы, должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал и при работе с ними и последующей утилизации необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.
8. Стоп-реагент может вызывать раздражение кожи и слизистых поверхностей при попадании на них. В этом случае необходимо обильно промыть водой место контакта.

### Способ применения

#### Подготовка исследуемых образцов

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо сохранять в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Отобранные образцы сывороток хранят при температуре +2 - +8° С не более 72 часов, для более длительного хранения их замораживают и хранят при минус 18°С и ниже, избегая многократного замораживания-оттаивания. Пробы, содержащие агрегаты или осадок, осветляют центрифугированием. Каждый образец отбирается индивидуальным наконечником. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

#### Подготовка реагентов

**Отмывка:** Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 25 раз. Хранение - 1 месяц при +2 - +8° С.

*Для анализа одного стрипа: 2 мл концентрата довести до 50 мл дистиллированной водой.*

**Конъюгат:** Концентрат конъюгата развести раствором для разведения конъюгата в 11 раз. Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

*Для анализа одного стрипа: 50 мкл концентрата конъюгата смешать с 500 мкл раствора для разведения конъюгата.*

### Проведение анализа

1. Выдержать набор при комнатной температуре (приблизительно 30 мин). Пакет с планшетом не открывать!
2. Встряхнуть все компоненты набора.
3. Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество проб + 3 контроля). Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть на защелку (пакетик с поглотителем влаги должен оставаться внутри).
4. **Внести по 50 мкл каждого исследуемого образца и каждой из контрольных сывороток** (К- – в дубле) в соответствующие лунки. Далее **внести по 50 мкл конъюгата** во все лунки (*вносить конъюгат удобно по стенке лунки, не касаясь наконечником ранее внесенной сыворотки*). **Заклеить** планшет заклейкой, **перемешать** содержимое лунок вращательными движениями планшета по поверхности стола в течение 30 сек и **инкубировать 1 час при 37° С**.
5. *Удалить жидкость из лунок и **промыть 5 раз** отмывкой (лунки должны заполняться полностью, но не переливаться). Удалить остатки жидкости постукиванием планшета по фильтровальной бумаге.*
6. **Внести по 100 мкл ТМБ и выдержать** при комнатной температуре в защищенном от света месте **30 минут**.
7. **Внести по 100 мкл стоп-реагента** для остановки реакции (соблюдать ту же последовательность добавления реагента, что и при внесении ТМБ) и немедленно провести учет результатов.

### Учет и интерпретация результатов

Проводят спектрофотометрически при длине волны 450 нм с настройкой “нуля” прибора (бланк) по воздуху. Проведение реакции считают корректной, если среднее значение оптической плотности в лунках с К- не более 0,2 оптических единиц (о.е.), а в лунке с К+ - не менее 0,7 о.е.

Расчет ОПкрит: **ОПкрит. = ОПср К- + 0,3**

**Результат анализа считают положительным, если ОП исследуемого образца превышает (ОПкрит + 10%) , и отрицательным, если ОП образца менее (ОПкрит – 10%).**

При попадании ОП образца в “серую зону” (ОПкрит ± 10%) результат считается пограничным.

Результат анализа для большей информативности может быть представлен в виде индекса антител:

**индекс антител = ОП образца : ОПкрит**

<i>Индекс</i>	<i>Результат</i>
< 0,9	Отрицательный
0,9 – 1,1	Пограничный (серая зона)
> 1,1	Положительный

Образцы с индексом ниже 0,9 оцениваются как не содержащие антител к возбудителю сифилиса.

Образцы с индексом более 1,1 оцениваются как содержащие антитела к возбудителю сифилиса.

*Внимание: Полученные результаты не могут служить основанием для постановки диагноза и должны интерпретироваться только в комплексе с анамнезом, данными клинического наблюдения и результатами других диагностических процедур.*

### ***Краткая схема проведения анализа***

**50 мкл тестируемых образцов и контрольных сывороток**

**+ 50 мкл конъюгата**

**перемешать 30 сек**

**Инкубация 1 час при 37°С**

*Отмывка 5 раз*

**+ 100 мкл ТМБ**

**Инкубация 30 мин при комнатной температуре в темноте**

**+ 100 мкл стоп-реагента**

**Измерение ОП при длине волны 450 нм**

**ВНИМАНИЕ!** Прежде, чем пользоваться данной схемой, внимательно ознакомьтесь со всей инструкцией к тест-системе