

Науково-виробнича компанія  
«Діапроф Мед»

**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СИФ**  
**Застосування імуноферментного ана**

(Практичний посібник)

УДК 616.972 - 074

Список скорочень, використаних у тексті  
Вступ

"Лабораторна діагностика сифілісу. Застосування сифілісу та його біологічні властивості імуноферментного аналізу" затверджено та рекомендовано до використання особливості сифілісу  
друку Вченою радою АТЗГ НВК "Діапроф Мед"

Імунна відповідь при сифілісі

Лабораторна діагностика сифілісу

Серологічні методи діагностики сифілісу  
Для лікарів-лаборантів медичних закладів, що працюють у лабораторіях (ІФА) для діагностики сифілісу імуноферментними тест-системами // Пономаренко В.М. та рекомендації при проведенні досліджень імуноферментним методом

Раєвська Г.С., Іванська Н.В.

Проблеми, що можуть виникати при проведенні ІФ

Література

Додаток

Київ, "Діапроф Мед", 2004

Скорочення, використані в тексті:

- АГ – антиген;
- АТ – антитіло;
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
- ГЗ – граничне значення;
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- К<sup>-</sup> – негативна контрольна проба;
- К<sup>+</sup> – позитивна контрольна проба;
- КСР – комплекс серологічних реакцій;
- МР – реакція мікропреципітації;
- ОГ – оптична густина;
- ОО – оптична одиниця;
- ОФД – ортофенілденіамін;
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
- РІ(Б)Т – реакція іммобілізації (блідих) трепанів;
- РНФ – реакція непрямой імунофлуоресценції;
- РПФ – реакція прямої імунофлуоресценції;
- РФК – реакція фіксації комплекменту;
- ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
- ВВІ – компанія «Boston Biomedica Inc.»;
- СІ – Центри США з проблем контролю та захворювань;
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз;
  - IgG, IgM, IgA – імуноглобуліни класів G, M, A;
  - RPR (rapid plasma reagin) test – тест на визначення реактивності плазми;
  - VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) test – тест на визначення вмісту реактивних веноеричних хвороб.



### Процедура

- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену)
- Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (поява забарвлення в лунках з позитивними зразками)
- Зупинка реакції, додано стоп-реагент
- Реєстрація оптичної густини

мембрану. **Форми** бактерій розташовуються в периглазмати́чній ділянці Фільтратів, форми бактерій Цист-Форми та L-Форми трепонем, виникають під дією лікувальних препаратів. Додатковий оболонки забезпечує несприятливих впливів, і тому зберігається в організмі протягом усього життя. Біологічні властивості збудника визначають перебіг хвороби, а при відсутності лікування – хронічний інфекційний процес [2].

**Клінічні особливості сифілісу**  
Сифіліс – системна інфекція, при якій прояв хвороби чергуються з прихованими періодами міжнародною класифікацією хвороб «МКХ Х», розподілені на клінічні стадії сифілісу:

#### Уродженний сифіліс

- Ранній вроджений сифіліс з симптомами
- Ранній вроджений сифіліс прихований
- Ранній вроджений сифіліс не чітко класифікований
- Пізнє вроджене сифілітичне пошкодження
- Пізній вроджений нейросифіліс
- нейросифіліс]

- Інші форми вродженого сифілісу
- Пізній вроджений сифіліс прихований
- Пізній вроджений сифіліс не чітко класифікований
- Уродженний сифіліс не чітко класифікований
- Ранній сифіліс

Первинний сифіліс статевих органів

Нейросифіліс не чітко класифікований

Інші симптоми пізнього сифілісу

Пізній сифіліс прихований

Пізній сифіліс не чітко класифікований

Інші не визначені чітко форми сифілісу

Прихований сифіліс, не чітко визначений, як ранній, так і пізній.

Інкубаційний період при сифілісі триває 3-4 тижні. Хвороба розпочинається з утворення шанкру – округлої виразки, з якої виділяється прозора рідина, що містить трепонеми. Через 20-30 днів шанкр зникає і ноді залишаючи шрам. Ця стадія первинного сифілісу. При вторинному сифілісі трепонема поширюється в організмі через кровоносну та лімфатичну системи, спричиняючи пошкодження шкіри та слизових оболонок, а також поладенопатію. Далі настає прихована стадія та зникають клінічні симптоми вторинного сифілісу. Наступна стадія – пізній сифіліс, який супроводиться ураженнями внутрішніх органів – серцево-судинної, нервової, кісткової систем, шкіри та слизових оболонок; усе це може викликати смерть від сифілісу.

Уроджений сифіліс виникає внаслідок зараження плоду під час вагітності. У заражених вагітних жінок трепонеми проникають через хоріоальні ворсинки плаценти на 5-му місяці вагітності. Якщо зараження трапилося наприкінці вагітності, то інфекційний процес розвивається в новонароджених так само, як і в дорослих осіб (за винятком ураження серцево-судинної системи). Не виключено можливість прихованого та тривалого безсимптомного перебігу інфекції, яка діагностується в дитини лише за позитивними серологічними реакціями [2].

## «DIA-IgM-SYPH»

імуноферментна тест-система для визначення антигену проти збудника сифілісу Treponema pallidum

## Етапи проведення імуноферментного аналізу

### Процедура

Полістиролові стрипи, сенсibilізовані антибіліями проти IgM людини

Внесення в лунки стрипів по 90 мкл розведеного сироваток та по 10 мкл зразків контролю сироваток

Інкубація 30 хв при 37 °С (формування IgM)

Промивання лунок буферним розчином 4 рази

- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину (перекису водню та хромогену)
- Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (поява лунках з позитивними зразками)
- Зупинка реакції, додано стоп-реагент
- Реєстрація оптичної густини

відповіді після проникнення блідої трепонеми в о частку макрофага. Т-лімфоцити та В-лімфоцити функціонують в організмі з бактеріями, призводять неспецифічної фагоцитарної реакції за допомогою дендрних лейкоцитів) та мононуклеарних моноцитів та тканинних макрофагів, що захоплення мікроорганізмів, а також процесинг їхніх антигенів і мунокомпетентним клітинам. У реакції можуть брати участь також «непрофесійні» (плазматичні клітини, фібробласти, перитити нерви ендотеліоцити каплярів), в яких відбувається трепонем у фаголізосомах. Отже, фагоцитоз незавершеною програмою; тому організм не зникає який зберігає вірулентність при ендоемітобіозі, а лише ізолює трепонем. У відповідь на стимулювання моноцитарного ряду підвищують синтез інтерферонів. Внаслідок їхнього впливу активується Т-лімфоцитів, що локально діють збудника, та запуск диференціації В-лімфоцитоплазматичні клітини, які виробляють антитіла [3].

Першими після інфікування T.pallidum специфічні антитіла класу IgM, що реєструються тижня після зараження та досягають найвищого рівня 6-9 тижні. Виявлення специфічних антитіл класу найбільше значення для виявлення вродженого сифілісу великі молекули IgM не проходять через плаценту знаходження їх у крові новонароджених внутрішньоутробне зараження сифілісом. На час після зараження організм починає синтезувати





<ul style="list-style-type: none"> <li>• Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену)</li> <li>• Інкубація 30 хв при 37 °С (забарвлення)</li> <li>• Зупинка реакції, додано стоп-реагент</li> <li>• Реєстрація оптичної густини</li> </ul>	<p><b>Лабораторна діагностика сифілі.</b></p> <p>Методи діагностики сифілісу традиційно групи – <u>прямі методи</u>, <u>направлені на виявлення непрямі</u> – серологічні тести для визначення антитілов до трепонеми.</p> <p>Донедавна <u>основним лабораторно-підходом при виявленні первинного сифілісу</u> <u>використовували</u> <u>темнопольні</u> <u>мазки</u>, <u>узятих</u> <u>з</u> <u>поверхневих осередків розвитку трепонем (шанкр слизових оболонок, на поверхні папул тощо).</u> <u>годиться для всіх видів «блідих» мікроорганізмів</u> <u>заломлюють світло, включаючи й сапрофітні</u> <u>Результати, отримані даним методом, можна використовувати для діагностики сифілісу</u> <u>реакцією прямої імунофлуоресценції (РІФ), коли люмінесцентного мікроскопа помітні спіралевидні об'єкти яких свіяться після обробки даних зразків антигенами трепонем, якщо ці антигени будуть позитивно забарвлені флуорохромними барвниками. Однак не завжди вживати з прихованими формами сифілісу, можна для описаних мікроскопічних досліджень [7].</u></p> <p>Сучасні методи виявлення збудника визначенні в досліджуваних зразках специфічними антитілами до трепонем, послідовностей нуклеїнових кислот T.pallidum. Наприклад, з них метод полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР (chain reaction), в основі якого лежить реплікація ДНК, відбувається розпітання подвійної спіралі ДНК, ланцюгів та комплементарна добудова обох ланцюгів та синтез нових ланцюгів (ПЛР). Чутливість ПЛР об'єктивна.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

спеціально обладнані приміщення, кваліфікований персонал, високоякісне й недешеве обладнання та високоочищені реактиви (особливо праймери).

Через біологічні властивості T.rallidum спроби вирощування ферментна тест-система для визначення антигену її поза живими клітинами довго не мали успіху, хоча є вже перші спроби проти збудника сифілісу Геронета rallidum відомості про розмноження цього мікроорганізму на живильному середовищі in vitro. Звичайно збудник сифілісу добре розвивається в організмі кролів, але хвороба в цих тварин триває протягом 3-6 місяців, а тому метод біологічної проби високочутливий, мало годиться для повсякденної клінічної практики.

Таким чином, через обмеження, притаманні прямому виявленню в клінічних пробах T.rallidum генетичного матеріалу, ці методи не завжди придатні та доступні для лабораторної практики. Тому для діагностики сифілісу широко застосовують непрямі (серологічні) тести.

### Серологічні методи діагностики сифілісу

Сучасні серологічні методи діагностики сифілісу складаються з трепонемних та нетрепонемних тестів. У нетрепонемних тестів використовують явище так званої антигенної мімікрії. Суть явища полягає в тому, що непреривній еволюції живих організмів та процесові горизонтальної передачі генетичної інформації клітинна T.rallidum містить ряд амінокислотних послідовностей (епітопів), спільних з епітопами таких «небактеріальних» сполук, як кардіоліпін (його звичайно виділяють з серцевого м'яза бика), лецитин та холестерин. До нетрепонемних тестів належить, зокрема, реакція фіксації комплекменту (РФК) – аналогі Wassermann. Аналіз сироватки проволять за допомогою

## «DIA-Trep»

### Етапи проведення імуноферментного аналізу

#### Процедура

методам  
чи її  
доступні  
сифілісу  
білками

сифілісу  
випадку  
званої

Внесення в лунки стрипів по 80 мкл розчи  
проб та по 20 мкл проб контролів та сироват  
Інкубація 60 хв при 37 °С (формування  
антитіло)

Промивання лунок буферним розчином (4

мікропреципітації (MP). При зараженні людини преципітат утворюється внаслідок взаємодії антитрепонемними антителами сироватки кардіоліпіновим антигеном. За кордоном в аналогії MP: VDRL-тест (за назвою лабораторії запропоновано тест – Veneral Disease Research Laboratory для визначення активних реактивів – USR (ultra-reagins); тест для виявлення швидких реактивів і (rapid plasma reagins); тест з толуїдиновим непрямою сироваткою – TRUST (toluidin red test).

У тесті VDRL використовують свіжж кардіоліпіновий антиген та інактивовану сироватку при механічному обертанні. У тесті USR вивчають нативну плазму та антиген, стабілізований холодною ЕДТА (такий антиген можна не готувати щодня) утворюються при цих реакціях, видно під мікроскопом RPR та TRUST для візуального обліку використовують активоване вугілля чи азобарвник.

Характеристики неспецифічних тестів дуже недостатньо чутливі, особливо на початку захворювання; при роботі з ними доводиться візуально для кожної проби окремо під мікроскопом, що призводить до суб'єктивних оцінок великої кількості хибно-позитивних результатів. Тест часто трапляються при системних та захворюваннях, багатьох вірусних інфекціях (мононуклеоз), захворюваннях сполучної тканини, та вакцинаціях, а також в осіб літнього віку. Крім позитивні реакції реєструються при нелугтах з

сифілітичну інфекцію.

Однією з перших серологічних реакцій для визначення в антитіл проти *T. pallidum* була реакція іммобілізації (Борнштайн) трепонеми [Рі(Б)Т чи РІТ], запропонована R.Nelson та M. Murchau 1949 р. Метод базується на уповільненні руху трепонеми шлясту впливом сироватки крові осіб, хворих на сифіліс. (Рейтер) висукаспецифічна, бо тут використовують як антиген суспензію Слабке блідих трепонем, отриманих з тканин при сифілітичному зараженні кролів. Однак саме трудності, пов'язані з виготовленням антигену, обумовлюють обмежене застосування трепонного централізованих лабораторіях. Серед недоліків РІБТ слід зазначити ОГ вказати недостатню її чутливість на стадії первинного сифілісу коли рівень антитіл (зокрема, IgM) недостатній для реєстрації не позитивного результату.

Більш поширений трепонемний тест – реакція неспецифічного імунофлуоресценції (РІФ, Fluorescent Treponemal Antibody Test) яка в багатьох країнах вважається “золотим стандартом” при апробації нових методів діагностики. Для дослідження патогенні бліді трепонеми (штам Nichols) фіксують на предметному склі, обробляють розведеною досліджуваною сироваткою чи спинномозковою рідиною, а потім антитілами проти людських імуноглобулінів класів G та/чи M, мічених флуоресцеїном. Мічений комплекс утворюється на поверхні трепонеми. Звичайно в клінічних лабораторіях при постановці РІФ-абс для розведення сироватки беруть екстракт непатогенних культуральних трепонем штаму Reiter, що сприяє видаленню неспецифічних антитіл та посиленню специфічності реакції.

Найпростіші для постановки реакції базуються на принципі гемаглютинації (реакція пасивної гемаглютинації, РПГА; *T pallidum* hemagglutination assay (ТРНА) що не потребують

Немає	4.2. Не внесено один із реагентів – сироватку, кон'югат або провяник.	4.2.1. Перест проби. Вне до "Інструментальні реакенти".
Слабке зараження сифілітичного кролика. Зараження трепонного антигену, пов'язані з виготовленням трепонного антигену, обумовлюють обмежене застосування трепонного централізованих лабораторіях. Серед недоліків РІБТ слід зазначити ОГ вказати недостатню її чутливість на стадії первинного сифілісу коли рівень антитіл (зокрема, IgM) недостатній для реєстрації не позитивного результату.	5.1. Зменшено час інкубації.	5.1.1. Інкубація згідно з "Інструкцією".
Більш поширений трепонемний тест – реакція неспецифічного імунофлуоресценції (РІФ, Fluorescent Treponemal Antibody Test) яка в багатьох країнах вважається “золотим стандартом” при апробації нових методів діагностики. Для дослідження патогенні бліді трепонеми (штам Nichols) фіксують на предметному склі, обробляють розведеною досліджуваною сироваткою чи спинномозковою рідиною, а потім антитілами проти людських імуноглобулінів класів G та/чи M, мічених флуоресцеїном. Мічений комплекс утворюється на поверхні трепонеми. Звичайно в клінічних лабораторіях при постановці РІФ-абс для розведення сироватки беруть екстракт непатогенних культуральних трепонем штаму Reiter, що сприяє видаленню неспецифічних антитіл та посиленню специфічності реакції.	5.2. Термін придатності тест-системи закінчився.	5.2.1. Результати тестування з належними придатності

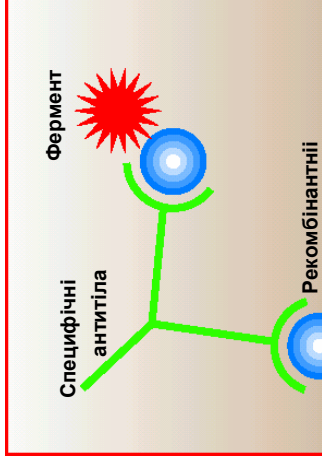
	2.3. Використання нефракціонованої крові.	2.3.1. Отримати сироватку повторно взявши пробуду крові. сифілісу	[7, 8]. До найсучасніших серологічних методів належать <u>імуноферментний аналіз</u> та <u>Western blot</u> . Вони дають змогу визначати антиген та/чи класу IgM, специфічні до білдої трепонеми чини. У класичному методі імуноблотинг використовують порез лізату T.pallidum у поліакриламідно окремі наконечники для тельно переносять на нітроцелюлозу, а далі кожної сироватки. з відбитками антигенів інкубують зі зразками сироваток та кон'югатом (антитілами проімуноглобулінів, що мічені ферментом). Смути, які використовують, антитіла проти яких присутні вносити одноразово досліджуваних осіб, забарвлюються. До модифікованих імуноблотингу належить <u>рекомбінантний імуноблотинг</u> на нейлонових стріпах [8, 9].
3. Високий фон в окремих рядах.	3.1. Повторне внесення в проявника.	3.1.1. Розчин проявника, антитіла проти яких присутні вносити одноразово досліджуваних осіб, забарвлюються. До модифікованих імуноблотингу належить <u>рекомбінантний імуноблотинг</u> на нейлонових стріпах [8, 9].	
	3.2. Переливання рідини з одного ряду в другий під час промивання.	3.2.1. Відрегулювати подачу промивного розчину.	<b>Імуноферментний аналіз (ІФА) в діагностиці сифілісу</b> Для діагностики сифілісу метод імуноферментного аналізу вперше запропонували J.Velkamp та A.Velkamp. ІФА полягає в тому, що специфічно зв'язуваної сироватки з антигеном, потім визначаються за допомогою кон'югату та проявника. При відсутності достатньої кількості мікробіореактиву слід після внесення кон'югату і реактивних наконечників видавати кон'югатів. Для діагностики найчастіше використовують варіант ІФА, конкурентний тип, «сандвіч» (ІФА, принцип роботи). У непрямому варіанті ІФА, принцип роботи полягає в тому, що кон'югат показує на рисунку 2 до складу імуносорбенту.
	3.3. Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату.	3.3.1. Для кон'югату та проявника мати окремі мікропіпетки. При відсутності достатньої кількості мікробіореактиву слід після внесення кон'югату і реактивних наконечників видавати кон'югатів. Для діагностики найчастіше використовують варіант ІФА, конкурентний тип, «сандвіч» (ІФА, принцип роботи). У непрямому варіанті ІФА, принцип роботи полягає в тому, що кон'югат показує на рисунку 2 до складу імуносорбенту.	



## ПРОБЛЕМИ, ЩО МОЖУТЬ ВИНИКАТИ ПІРІ ПРОВЕДЕННІ ІФА

Рис. 2

Проблеми, що виникають	Можливі причини	Засоби усунення проблем	У
1. Високий фон (забарвлення) в лунках всього планшету.	1.1. Низька якість дистильованої води.	<p>1.1.1. Промити дистильованою водою посуд, а потім дистильованою водою.</p> <p>1.1.2. Прокристалити дистильовану воду в відкритій посудині протягом 10-15 годин.</p> <p>1.1.3. Використовувати дистильовану воду.</p>	<p>«сандвіч-варіанті» ІФА (див. рис. 2), що зв'язалися з антигенами на частоті за допомогою кон'югату, до складу якого входять антигени, які використано в складі імуносорбенту. Можна знайти в сироватці крові хворих протіілобуліни всіх класів (IgA, IgM, IgG) та до більшості чутливості тестування. Специфічність більшості класів можна також визначити в іншому цілком конкурентному ІФА, який застосовують для діагностики сифілісу. У цьому випадку, де проходить реакція, присутні мікроантитіла проти T.pallidum; вони використовують як конкурентними антитілами за обмежену кількість специфічного зв'язування. При цьому величина опортунізму досліджуваної проби обернено-пропорційно до величини специфічних антитіл.</p>
1.2. Бактеріальне забруднення води.	1.2.1. Зберігати дистильовану воду в закритому посуді.	1.2.1. Зберігати дистильовану воду в закритому посуді.	
1.3. Забруднений промивач (вошер).	1.3.1. Почистити голівку промивача за допомогою голки та промити її 30 % розчином етилового спирту, а потім кілька разів дистильованою водою.	1.3.1. Почистити голівку промивача за допомогою голки та промити її 30 % розчином етилового спирту, а потім кілька разів дистильованою водою.	







дистильованою водою, не допускаючи утворення осадурезультатів. промивного розчину та забруднення каналів промивної системи.

Щотижня слід знезаражувати промивач 30 %-ним розчином аблиця 1. Результати визначення антитіл проти етилового спирту, а потім 5 разів промити дистильованою водою. та можлива інтерпретація отриманих

Спектрофотометри багатоканальні (ридери, імунофлуоресценція) визначеність специфічних антитіл проти аналізатори) T. pallidum

Спектрофотометри використовуються для автоматичної реєстрації результатів ІФА, а тому необхідно періодично (щодня) проводити метрологічний контроль. Метрологічна перевірка забезпечує правильність отримуваних результатів.

У повсякденній практиці ІФА слід не забувати про те, що для виходу на робочий режим прилад має прогрітися (час прогрівання для кожного конкретного приладу вказано в інструкції до нього). Є прості засоби для перевірки точності роботи спектрофотометра.

Щоб перевірити відтвореність спектрофотометричної оцінки результату в кожній лунці планшета, необхідно декілька разів повторити визначення ОГ в тих самих лунках планшета.

Щоб оцінити рівномірність результатів вимірювання по всій як поверхні планшета, слід в усі лунки порожнього чистого планшета внести однаковий об'єм забарвленого розчину. Такий розчин виготовувати, додавши до розчину проявника (його ідентифікувати відповідно до інструкції для даної тест-системи) невелику кількість пероксидазного кон'югату. Кількість кон'югату при підбиранні розчину лежала в інтервалі від 0,3 до 1,0 оптичної одиниці (ОД). Після внесення такого розчину в усі лунки планшета та дозрівання стоп-реагента проводять спектрофотометричне вимірювання. Відхилення від середнього результату вимірювання в межах доцільно вибирати планшета не повинне перевищувати 5 %.

Для більш коректної оцінки результатів ІФА слід працювати з вторинного рецидивного сифілісу можна вдатися

T. pallidum		IgM	Сумарні антитіла (IgM, IgG, IgA)	Ранні початок
ІгМ	Сумарні антитіла (IgM, IgG, IgA)			
+	+	+		Ранні початок
+	+	+		Звернення серологічної реакції
-	-	-	+	Можливі сифіліс

Як видно з таблиці 1, на стадії вторинного рецидивного сифілісу доцільно скористатися тестом на визначення антитіл класу IgM чи сумарних антитіл (IgM, IgG, IgA) у сироватці крові. Виявлення специфічних IgM за допомогою сироваткових антитіл до IgM у сироватках заражених осіб при гострому сифілісі, а серологічно ці дві форми важко відрізнити. Виявлення специфічних IgM у сироватках заражених осіб при гострому сифілісі, а серологічно ці дві форми важко відрізнити. Виявлення специфічних IgM у сироватках заражених осіб при гострому сифілісі, а серологічно ці дві форми важко відрізнити. Виявлення специфічних IgM у сироватках заражених осіб при гострому сифілісі, а серологічно ці дві форми важко відрізнити.



що якість відмивання планшета – це один з основних факторів при проведенні ІФА, тому до цього треба ставитися дуже уважно. При проведенні лабораторних досліджень необхідно стежити за рівномірністю заповнення лунки і питанні про вибір тест-системи. Необхідно рідіни з усіх лунок планшета. Проміжок чапратіжкою, для оцінки якості та придатності заповнення лунок розчином для промивання та видалення рідини використовують наукові, медичні та економічні критерії вибору методу включують визначення специфічності та відтворюваності діагностикумів.

#### Правила роботи з кон'югатами та проявником

Для внесення кон'югату та проявника слід мати окремі **Чутливість** – показник, що характеризує мікропіпетки та ванночки з позначками, що їх використовують **Чутливість** виявляти максимальну кількість істинних сироваток, вказує долю інфікованих осіб, яку можна виявити в тест-системі. Чутливість і

Слід виключити можливість контакту проявника з синтетичними засобами для миття та з хлорамином. Тобто, проявляю:

роботи з проявником необхідно брати окремих посуд та наконечники. Дезинфекцію інструментів та допоміжних матеріалів слід проводити 6 %-ним розчином перекису водню чи 70 %-ним етиловим спиртом.

Неприпустимий контакт таблеток ОФД та розчину **Чутливість** також готового розчину проявника з металами.

Розчин проявника безпосередньо перед його застосуванням має бути прозорий та безколірний. Планшет з внесеним субстратом та хромогеном слід тримати в темряві. Рештки розчину у ванночці не рекомендують виливати до закінчення інкубації планшета, про проявником. Проявник, що лишається у ванночці, має лишатися незабарвленим протягом 30 хв; поява забарвлення у ванночці з проявником свідчить про його забруднення.

$$\text{Специфічність} = \frac{H}{H + XH} \times 100\%$$

Періодичний контроль роботи обладнання – кількість негативних результатів аналізу, **Важливий фактор**, що впливає на проведення ІФА – **Чутливість** позитивних результатів аналізу. **Важливий фактор**, що впливає на проведення ІФА – **Чутливість** позитивних результатів аналізу. Таким чином, чутливішою буде та тест-система, яка дає менше негативних результатів аналізу.



4. У ході роботи тримайте піпетку вертикально від вертикалі 10°). (максимальне відхилення від вертикалі 10°). курсу лікування).
5. Для кращої роботи щільно тримайте піпетку в руці, великий палець має лежати на операційній кнопці. Послідовність роботи при внесенні біологічної рідини в буфери для розведення зразків показано на рисунках 6 та 7.

Початкове

положення

Перший упор

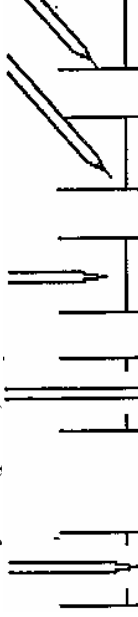
Другий упор



Обстежені контингенти	Кількість обстежених осіб
Особа, обстежені без попереднього цитозу	88
Хворі з первинним сифілісом	12
Хворі з вторинним рецидивним сифілісом	32
Хворі з вторинним прихованим сифілісом	16
Особа, що знаходяться на превентивному лікуванні	2
Особа після лікування від сифілісу в стаціонарі	51

Рис.6

- Занурте наконечник на 2-3 мм в біологічну рідину, натисніть на операційну кнопку до першого упору (рис.6) плавно відпустіть кнопку.
- Не витягаючи наконечника з рідини, обережно відіть кнопку у початкове положення.
- Занурте наконечник на 2-3 мм у розчин, куди перенести набрану рідину, натисніть на операційну кнопку до першого упору. Уникайте дотиків наконечника до та дна лунок (рис.7).





слід обов'язково знезаражувати та утилізувати.

Не можна використовувати для аналізу компоненти з різних серій, бо всі компоненти тест-системи та умови аналізу (зокрема, робоче розведення кон'югату) виробником для кожної серії наборів.

Дотримання інструкції щодо правил роботи в лабораторних приміщеннях, де зберігаються тест-системи та проводяться дослідження методом ІФА

Неприпустима присутність на робочому місці в лабораторії парів окислювачів (відкритих посудин з розчинами перекису водню, гіпохлориту тощо). Не дозволяється зберігати та використовувати розчини з хлором у приміщеннях, де в цей час проводять дослідження методом ІФА.

Таблиця 3. Вивчення чутливості тест-систем «DIA-Тер», «DIA-SYPH» та «DIA-SYPH» на сироватках, взятих у хворих на сифіліс

Кількість зразків	«DIA-SYPH»	«DIA-SYPH»
28	28	28
27	27	27
137	137	137
23	23	23

Дотримання термінів та умов зберігання наборів

Якісна робота з діагностичними наборами гарантується виробником лише в межах вказаного терміну придатності набору. Дотриманні відповідних умов зберігання.

При вивченні чутливості тест-систем з різних груп від хворих різних груп (Таблиця 3) показує, що «DIA-SYPH» дає змогу встановити наявність інфекції на всіх стадіях процесу. Тест-система дає змогу встановити наявність антител проти T.pallidum – «DIA-SYPH»

Загальні рекомендації для якісного проведення аналізу сироватки від хворих з діагнозом первинного сифілісу  
Оскільки при постановці ІФА одночасно досліджують велику кількість проб, їх можна перешлугати при внесенні в схему планування. Щоб цьому запобігти, рекомендується до початку аналізу Антитіла класу IgM, наявність яких виявляють заповнити протокол дослідження, де на схемі планшета вказано «DIA-IgM-SYPH», найчастіше виявляють плановану послідовність внесення проб. Така схема дозволяє встановити первинний сифіліс, але лабораторії рекомендується використовувати первинні сироватки від хворих з діагнозом первинного сифілісу.

сироваток крові (фірми BVI Inc.), які містять антитіла проучту еритроцитів та фібрину здійснюють таким чином у різних титрах. Результати ІФА представлено в таблиці 4. Результати ІФА представлено в таблиці 4 у вигляді співвідношень оптичних густин (ОГ) проб до видко утворився згусток (фібриноген, що є граничного значення (ГЗ). Зразки, для яких співвідношення ІФА-системах), може стати джерелом хибно-позитивної ОГ/ГЗ перевищує 1,0 – позитивні. Крім результатів ІФА-системах). Після інкубації «відводять» згусток таблиці подано (з паспортних даних до набору) результати стерильною пастерівського піпеткою та вміст тестування цих проб у комерційних тестах – тесті швидкодіяльнік при температурі 2-8 °С. Проби центр плазменних реактивів (PPR), реакції імунофлуоресценції при температурі 2-8 °С. Такі сироватки можна зберігати в ABS (PIF-абс).

Якщо проби не вдається проаналізувати протягом

Таблиця 4. Вивчення чутливості тест-систем «DIA-SYPH», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH» на панелі сироваток PSS201

Номер панелі зразка	West.-Dick. RPR тип	Wampole RPR тип	Zeus FTA-ABS результат
PSS201-01	8	32	Поз.
PSS201-02	2	8	Поз.
PSS201-03	Нег.	Нег.	Поз.
PSS201-04	Нег.	Нег.	Поз.
PSS201-05*	Нег.	Нег.	Нег.
PSS201-06	16	64	Поз.
PSS201-07	1	2	Поз.
PSS201-08	4	8	Поз.
PSS201-09	1	4	Поз.
PSS201-10	4	16	Поз.
PSS201-11	1	4	Поз.
PSS201-12	Нег.	Нег.	Поз.



К	11,3	13,5	PSS201-22	Нег.	Нег.
			PSS201-23	15,4	2
			PSS201-24	1	4
			PSS201-25	8	128

Оцінку міжсерійного коефіцієнту варіації проводили також з використанням сироваток, вказаних у таблиці 6, на чотирьох серіях тест-систем «DIA-Tгер» та чотирьох серіях «DIA-SYPH». При цьому для тест-набору «DIA-Tгер» цей показник складає 7-14 %, а для тест-системи «DIA-SYPH» – 5-12 %.

У тест-системах «DIA-SYPH» та «DIA-Tгер» позитивні зразки набору PSS201 виявлялися як позитивні «DIA-IgM-SYPH» визначалися як позитивні зразків, що відповідає паспортним даним цього сироваток не містили антитілі класу IgM).

### Вимоги та рекомендації при проведенні досліджень методом ІФА

Коректної постановки аналізу досягають при неухиальному проведенні перерахованих далі умов та вимог.

Якісна підготовка посуду

Посуд має добре митися з використанням рідких засобів для миття, які не містять біодобавок, та ретельно ополіскуватись проточною, а потім дистильованою водою. Посуд, використований для розчину ОФД, не можна мити, застосовуючи засоби для миття. Такий посуд слід щоразу ополіскувати 70 %-ним розчином етилового спирту, а потім дистильованою водою. Варто виділити окремих посуд для роботи з розчинами ОФД.

Вивчення специфічності тест-систем для «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH» проводили, використовувши 2043 неселективних зразки донорської крові, а також зразки сироваток крові, представлено результати вивчення специфічності тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH» у таблиці 5.

Таблиця 5. Вивчення специфічності тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH»

Вивчена група	Кількість зразків	«DIA-Tгер»	«DIA-SYPH»	«DIA-IgM-SYPH»
Донори крові	2043			

Особливо високі вимоги слід ставити до чистоти посуду, який використовується для проведення досліджень.

відтворюваність. Величини, що характеризують позитивні (К<sup>+</sup>) та негативні (К<sup>-</sup>) контроли відтворюваності – стандартне відхилення та коефіцієнт варіації цих досліджень представлено в таблиці вираховують після дослідження наборів позитивних сироваток.

Стандартне, чи середньо-квадратичне відхилення в межах планшета та поміж планшетами визначають за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, d = X_i - X_{cp}$$

де d – різниця між окремими показниками оптичної густини та середньою арифметичною величиною ( $X_i - X_{cp}$ ); n – кількість досліджених сироваток;  $X_i$  – оптична густина досліджуваного зразка сироватки;  $X_{cp}$  – середнє арифметичне оптичної густини всіх досліджених зразків.

При дослідженні сироваток показник стандартного відхилення дає узагальнену характеристику відхилень усіх варіантів ОГ для даного діагностикуму. Тому при порівнюванні показників різних тест-систем для визначення відхилень всередині серії та поміж різними серіями рекомендується користуватися коефіцієнтом варіації (CV), що являє собою відношення стандартного відхилення до середнього значення виражене в процентах.

Коефіцієнт варіації (CV) вираховують за формулою:

$$CV = \frac{\sigma}{X_{cp}} \times 100 \%$$

Високий показник CV свідчить про велику варіабельність оптичної густини при роботі з даною тест-системою. Крім того досліджують показники негативних та позитивних контролів. При цьому коефіцієнт варіації стандартних відхилень від середнього значення позитивних та негативних контролів не

Таблиця 6. Вивчення коефіцієнту варіації в межах планшета та поміж планшетами тест-систем «DIA-Тер» та «DIA-SY

Характеристика оптичної сироватки	«DIA-Тер»	
	CVп, %	CVм, %
1	5,7	7,8
	5,8	7,9
1	4,9	8,4
	6,1	8,2
3	1,6	2,3
1	6,8	8,9
	0,9	1,7