

Науково-виробнича компанія
«Діапроф Мед»

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СИФ
Застосування імуноферментного ана

(Практичний посібник)

Скорочення, використані в тексті:

- АГ – антиген;
- АТ – антитіло;
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
- ГЗ – граничне значення;
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- К⁻ – негативна контрольна проба;
- К⁺ – 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 наявності в крові реактиву Венеричних хвороб.

Процедура

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

Форми бактерій розташовуються в периглазмати́чній ділянці мембрану Форми бактерій 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 симптоматичним проявом
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. Це 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 антипроти збудника сифілісу Тгеропета pallidum

Етапи проведення імуноферментного аналізу

Процедура

Полістиролові стрипи, сенсibilізовані антитілами 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
- Реестрація 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

«DIA-SYPH»

імуноферментна тест-система третього покоління для визначення антитіл проти збудника сифілісу Treponema pallidum

Рис. 1

Після успішно проведеного лікування кількість антитіл класу IgG у крові поступово падає, але в деяких осіб, що перехворіли на сифіліс, імуноглобуліни цього класу можуть зберігатися тривалий час та виявлятися за допомогою високочутливих реакцій – РІФ, РІБТ, імуноблотингу та ІФА. Існують деякі особливості гуморальної відповіді при сифілісі, обумовлені структурою збудника, а саме тим, що блда трепонема містить приблизно в 100 разів менше імуногенних білків, пов'язаних із зовнішньою мембраною, ніж типові грам-негативні мікроорганізми [5]. Найперспективнішими для діагностики вважаються ліпопротеїни з молекулярними масами 15, 17, 41-45 та 47 кДа (p15, p17, TmpA та p47). По-перше, названі антигени видоспецифічні, тобто характерні лише для патогенної трепонеми. По-друге, антитіла в крові хворих на сифіліс виявлено проти кожного з цих білків, що свідчить про їхню високу імуногенність.

Білок p17, який належить до внутрішньої мембрани протоплазматичного циліндра Treponema pallidum, викликає найактивніший синтез антитіл, особливо на стадії вторинного сифілісу; тому цей компонент назвали «основним мембранним білком». Разом з ліпопротеїном p15 його можна успішно використовувати для диференційної діагностики сифілісу та Лайма (так званого кліщового бореліозу, або кліщового спірохетозу) Білок p47 так званий антиген що зв'язує

Етапи проведення імуноферментного аналізу

Процедура

Внесення в лунки стрипів по 60 мкл розчину зразків контролю та сироваток зразків пацієнтів. Інкубація 90 хв при 37 °С (формування комплексу антиген-антитіло з кон'югатом). Промивання буферним розчином (8 разів)

Внесення в лунки стрипів по 60 мкл розчину зразків контролю та сироваток зразків пацієнтів. Інкубація 90 хв при 37 °С (формування комплексу антиген-антитіло з кон'югатом). Промивання буферним розчином (8 разів)

<ul style="list-style-type: none"> • Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену) • Інкубація 30 хв при 37 °С (забарвлення) • Зупинка реакції, додано стоп-реагент • Реєстрація оптичної густини 	<p>Лабораторна діагностика сифілі.</p> <p>Методи діагностики сифілісу традиційно групи – <u>прямі методи</u>, <u>направлені на виявлення непрямі</u> – серологічні тести для визначення антитілов трепонеми.</p> <p>Донедавна <u>основним лабораторно-підходом при виявленні первинного сифілісу</u> <u>мікроскопіі в темному полі</u> мазків, узятих з поверхневих осередків розвитку трепонем (шанкр слизових оболонок, на поверхні папул тощо). годиться для всіх видів «блідих» мікроорганізмів, заломлюють світло, включаючи й сапрофітні. Результати, отримані даним методом, можна використовувати для діагностики сифілісу. Для цього використовують реакцію прямої імунофлуоресценції (РІФФ), коліметричний метод, люмінесцентного мікроскопа помітні спіралевидні обolonки яких світяться після обробки даних препаратів антигітлами проти трепонем, якщо ці антигітми пофарбовані флуорохромними барвниками. Однак не завжди можна виявити трепонемні форми сифілісу, можна використовувати інші методи досліджень [7].</p> <p>Сучасні методи виявлення збудника сифілісу визначенні в досліджуваних зразках специфічними методами послідовностей нуклеїнових кислот T.pallidum. Наприклад, з них метод полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР (PCR, chain reaction), в основі якого лежить реплікація ДНК, відбувається розплітання подвійної спіралі ДНК, синтез нових ланцюгів ДНК. Чутливість ПЛР об'єктивна та комплексна, дозволяє добувати обидві ланцюги та комплементарна добувати обидва ланцюги нових ланцюгів ДНК.</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 прямого виявлення 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 нетрепонемні 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) – аналог реакції Вассермана. 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 проводити тестування 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 нелугах з

сифілітичну інфекцію.

Однією з перших серологічних реакцій для визначення в антитіл проти *T. pallidum* була реакція іммобілізації (Бордета-Трепонем [Р(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. (Рейдінг) високоспецифічна, 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 трепонемного 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.

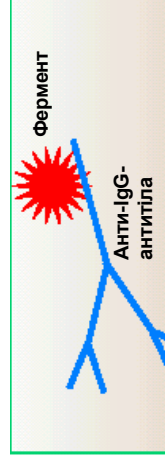
Більш поширений трепонемний тест – реакція неспецифічної імунофлуоресценції (РІФ, Fluorescent Treponemal Antibody Test) яка в багатьох країнах вважається “золотим стандартом” при апробації нових методів діагностики. Для дослідження патогенні бліді трепонеми (штам Nichols) фіксують на предметному склі, 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 прованник.	4.2.1. Перест проби. Вне до "Інструкції реагенти."
Слабке зараження в сифілітичному зараженні трепонемного кролика. Обмежене застосування трепонемного РІБТ. 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"
Реакція неспецифічної 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 належним придатності

результатів. Застосування технології рекомбінантних ДНК, включаючи клонування, експресію генів та виділення рекомбінантних трепонемних антигенів, дали поштовх до створення тест-систем нового покоління. Проте при роботі з тест-системами на основі таких антигенів виникає небезпека, що імуносорбенти, до складу яких входять аналоги не всіх, а лише деяких антигенних детермінант, можуть не охопити всього спектру антитіл, які утворюються при зараженні *T. pallidum*. Тому ряд спеціальних досліджень направлено було саме на виявлення цих антигенів та імунодомінантних епітопів; внесення їх до складу імуносорбенту дає змогу значно підвищити чутливість ІФА [10].

Щоб досягти високих діагностичних характеристик імуноферментної тест-системи, слід не лише оптимізувати склад імуносорбенту, але й використати високоспецифічний противидовий кон'югат. Він може включати моно- чи поліклональні антитіла проти людських імуноглобулінів класів G та/чи M людини, кон'югованих з ферментом. Слід зауважити, що в деяких тест-системах такого типу використовують мічений ферментом рекомбінантний білок А (аналог білку А *Staphylococcus aureus*) як компонент, що зв'язує сироваткові антитіла. Такий кон'югат дає змогу виявляти антирепонемні імуноглобуліни лише класу G (підкласи IgG1, IgG2, IgG4).

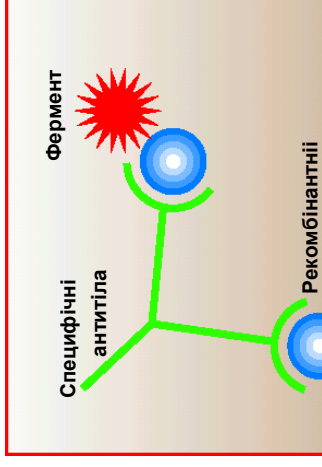


1.5.1. Не виконувати зберігати що містяться приміщення проводиться методом ІФА	1.5. Наявність і використання на робочому місці дезрозчинів, що містять хлор.	1.5.1. Не виконувати зберігати що містяться приміщення проводиться методом ІФА
1.6.1. Наконечники використовувати одноразово.	1.6. Повторне використання наконечників.	1.6.1. Наконечники використовувати одноразово.
1.7.1. Усунути хромогену з хромогену з металлами (пінцет, скальпель тощо).	1.7. Контакт хромогену з металлами (пінцет, скальпель тощо).	1.7.1. Усунути хромогену з хромогену з металлами (пінцет, скальпель тощо).
1.8.1. Промити згідно з "Інструкції".	1.8. Зменшено кількість циклів промивок планшету.	1.8.1. Промити згідно з "Інструкції".
1.9.1. Заборони використовувати системи.	1.9. Закінчився термін придатності тест-системи.	1.9.1. Заборони використовувати системи.
1.10.1. Мити дезінфікувати відповідно "Інструкції".	1.10. Забруднений посуд.	1.10.1. Мити дезінфікувати відповідно "Інструкції".
1.11.1. Дотримуватися режиму інкубації.	1.11. Підвищено температуру або продовжено термін інкубації.	1.11.1. Дотримуватися режиму інкубації.
2.1. Переливання	2.1. Переливання	2.1. Переливання

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.	1.1.1. Промити дистильовану воду розчином кислоти, а потім дистильованою водою. 1.1.2. Прокристалити дистильовану воду відкритий протягом 10-15 вистояти використаням.	«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 при обурі. Специфічність більшої чутливості тестування. Специфічність можна також визначити в іншому цілком конкурентному ІФА, який застосовують для діагностичної сифілісу. У цьому випадку, де проходить реакція, присутні мікроантигени, полклональні антитіла проти T.rallidum; вони використовують як конкурентними антитілами за обмежену кількість специфічного зв'язування. При цьому величина опору досліджуваній пробі обернено-пропорційно до специфічності антитіл.
1.2. Бактеріальне забруднення води.	1.2.1. Зберігати досліджувану воду в закритому посуді. 1.2.2. Дистильовану воду використовувати протягом дня.	1.2.1. Зберігати досліджувану воду в закритому посуді. 1.2.2. Дистильовану воду використовувати протягом дня.	
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.	



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 рідити за усіх лунках планшета. Проміжок чапуагіжкою, для оцінки якості та придатності заповнення лунки розчином для промивання та видалення рідких залишків, 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** – показник, що характеризує мікропіпетки та ванночки з позначками, що їх використовують для цієї меті.

Слід виключити можливість контакту проявника з хлорамином. Також слід виключити можливість контакту проявника з хлорамином. Також слід виключити можливість контакту проявника з хлорамином.

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 проявника з металами. 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. Проявником. Проявник, що лишається у ванночці, має лишатися незабарвленим протягом 30 хв; поява забарвлення у ванночці з проявником свідчить про його забруднення.

Періодичний контроль роботи обладнання

Важливий фактор, що впливає на проведення ІФА – періодичний контроль роботи обладнання. Тому слід неомінно проводити періодичний контроль роботи обладнання. Тому слід неомінно проводити періодичний контроль роботи обладнання.

$$\text{Чутливість} = \frac{P}{P + XH} \times 100\%$$

де P – кількість позитивних результатів аналізу, XH – кількість негативних результатів аналізу.

Специфічність – здатність тест-системи лише той компонент, для визначення якого її створено. Показник, що характеризує здатність діагностикуму мінімальну до хибно-позитивних результатів. Визначають за формулою¹:

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

де H – кількість негативних результатів аналізу, XH – кількість позитивних результатів аналізу.

позитивних чи негативних стандартних контрольних панелей (воложення). Таким чином наконечник наступним обчисленням показників. При цьому сироватку розмішувати. Повторіть цю процедуру 2-3 рази. Позитивних контрольних панелей мають бути охарактеризовані. Наостанку натисніть операційну кнопку та отримані як від хворих з ранньою сероконверсією, так і відерепони для повного звільнення наконечника осіб з різними проявами хвороби; це значить, що до набору витягніть наконечник з розчину і відпустіть. мають входити як низькотитражні сироватки, так і сироватки знопу в початкове положення.

вищими титрами антитіл.
Тому чутливість тест-системи можна встановити допомогою механізму для зняття наконечника з основи результатів, отриманих при тестуванні:

- набору сироваток, позитивних щодо даної інфекції та наступним зразком біологічної рідини.
- взятих від заражених осіб на різних стадіях При роботі з сироватками чи іншими рідинами захворювання;
- комерційних панелей (ВВІ, НАВІ, ВСРІ, ГІСК) наконечника, і це може змінити об'єм піпетованої

Визначення специфічності тест-системи здійснюють за допомогою порівняння, якщо змочити наконечник у піпетуванні великої кількості сироваток випадково вибраних, правильно її перемішати, як описано вище клінічно здорових осіб, враховуючи показники первинної оцінки сироватки потрібний об'єм. повторної реактивності позитивних зразків у цій тест-системі з наступною верифікацією результатів.

Достатньо часто, при визначенні чутливості на Температурний режим та час інкубації специфічності імуноферментних чи інших тест-систем. При проведенні аналізу температура в лабораторних охарактеризованих наборах сироваток ці показники.

наближаються чи досягають 100 % – результатів, неможливіх як правило, інкубація досліджуваних сироваток умов практичної повсякденної лабораторної діагностики проводиться в термостаті. Для рівномірного прогресу. Сьогодні немає діагностикумів, які гарантували б абсолютну чутливість поліщю термостату та специфічність досліджень.

паперу.

Інкубацію проб з різним проявником, що містить антиген, проводили при кімнатній температурі. При діагностичних центрів провели дослідження показників, що за стандартну кімнатну температуру інформативності тест-систем «DIA-Titer», «DIA-SYPH» та «DIA-Titer» порівняно з температурою 18-25 °С. Сама на неї розраховано тривалість «DIA-SYPH» для серологічної діагностики сифілісу порівняно з інструкції. Якщо температура в кімнаті

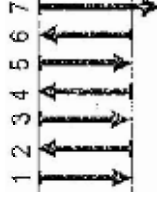
4. У ході роботи тримайте піпетку вертикально від вертикалі 10°). (максимальне відхилення від вертикалі 10°). курсу лікування).
5. Для кращої роботи щільно тримайте піпетку в руці, великий палець має лежати на операційній кнопці. Послідовність роботи при внесенні біологічної рідини в буфери для розведення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



сироваток крові (фірми BVI Inc.), які містять антитіла проучіть еритроцитів та фібрину здійснюють таким чином у різних титрах. Результати ІФА представлено в таблиці 4 у вигляді співвідношень оптичних густин (ОГ) проб до видикло 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 реагів (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, використавши 2043 неселективних зразки донорської крові, а також зразки сироваток крові, представлено результати вивчення специфічності тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH».

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

Вивчена група	Кількість зразків	«DIA-IgM-SYPH»
Донори крові	2043	9

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

Стандартне, чи середньо-квадратичне відхилення Таблиця 6. Вивчення коефіцієнту в в межах планшета та поміж планшетами тест-систем «DIA-Тер» та «DIA-SY

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

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

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