

УТВЕРЖДЕНА

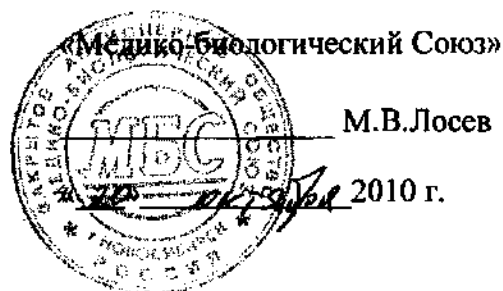
УТВЕРЖДАЮ

КОПИЯ
ВЕРНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г. № _____

Директор ЗАО



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Сиф-IgG-ДС-стрип»

Набор реагентов для иммуноферментного выявления видоспецифических антител класса G к *Treponema pallidum*

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов «Сиф-IgG-ДС-стрип» предназначен для выявления видоспецифических антител класса G к *Treponema pallidum* в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

1.2 Набор реагентов позволяет выявлять видоспецифические антитела класса G к *Treponema pallidum* в сыворотке (плазме) крови человека в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные образцы.

2.2 При исследовании небольшого количества сывороток на разборных планшетах возможно проведение 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном ИФА с применением рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum* и моноклональных антител мыши к IgG человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum*, сорбированными на поверхности лунок планшета. При наличии в сыворотке видоспецифических антител класса G к *Treponema pallidum* происходит связывание их с антигеном, при этом образуются иммунные комплексы «антиген-антитело».

На второй стадии анализа видоспецифические антитела класса G к *Treponema pallidum* выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека с пероксидазой хрена.

После отмывки несвязавшихся компонентов конъюгата комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета. Чем выше содержание видоспецифических антител класса G к *Treponema pallidum* в сыворотке, тем интенсивнее окрашен раствор.

Набор реагентов выпускают в виде комплекта 1 для ручной постановки – на 96 определений.

2.4 Состав комплекта приведен в таблице 1.

Таблица 1

Наименование компонента	Комплект 1
планшет-иммуносорбент – рекомбинантные антигены <i>Treponema pallidum</i> , сорбированные в лунках разборных планшетов	1 шт.
K+ – положительный контрольный образец, инактивированный – прозрачная красного цвета	1 фл. (2,0 мл)

жидкость	
К – отрицательный контрольный образец, инактивированный – прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)
Кг – конъюгат – прозрачная вязкая синего цвета жидкость	1 фл. (0,3 мл)
РБР-К – разводящий буферный раствор для конъюгата – прозрачная зеленого цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном взбалтывании	1 фл. (13,0 мл)
РБР-С – разводящий буферный раствор для сывороток – прозрачная розового цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном взбалтывании	1 фл. (10,0 мл)
БРС – буферный раствор субстрата – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13,0 мл)
ТМБ – тетраметилбензидин – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (0,5 мл)
ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твинном – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (26,0 мл)
Стоп-реагент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)
инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в набор вкладывают клейкую пленку для планшета, ванночки для реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор реагентов должен выявлять антитела класса G в сыворотках панели сывороток «П-АТ(+/-)T.pallidum», содержащих антитела класса G к *Treponema pallidum*, и не выявлять антитела класса G в сыворотках этой же панели, не содержащих антитела класса G к *Treponema pallidum*

3.2 Чувствительность. Степень способности набора реагентов выявлять положительные сыворотки стандартной панели предприятия «П-АТ(+/-)T.pallidum» методом ИФА без ложноотрицательных результатов – 100 %.

3.3 Специфичность. Степень способности набора реагентов выявлять отрицательные сыворотки стандартной панели предприятия «П-АТ(+/-)T.pallidum» методом ИФА без ложноположительных результатов – 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2Б (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором реагентов соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3 Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4 При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки), т.к. контрольные образцы и исследуемые сыворотки следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собирать в специальном контейнере, затем обработать дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, например, раствором перекиси водорода (ГОСТ 177) с массовой долей 6 % при комнатной температуре не менее 2 ч.

4.6 Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, например, раствором этилового спирта (ГОСТ Р 51652) с объемной долей 70 % в течение нескольких секунд.

4.7 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Устройство для промывки микропланшетов или восьмиканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;

- пипетка полуавтоматическая одноканальная с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей от 40 до 200 мкл,

аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 650 нм;
- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная;
- спирт этиловый;
- водорода перекись;
- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для анализа использовать сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся не более 48 ч при температуре от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$ или не более трех месяцев при температуре минус $20 ^\circ\text{C}$.

6.2 Для проведения анализа использовать сыворотку (плазму) крови человека объемом 10 мкл.

6.3 Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять сыворотки, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией.

6.4 Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания сывороток.

6.5 Перед проведением анализа каждую исследуемую сыворотку тщательно перемешать.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа:

- при проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов;
- для приготовления растворов использовать чистую посуду;
- в процессе промывки полностью заполнять лунки планшета без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с;
- не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов;
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором спирта этилового с объемной долей 70 %, не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для рабочего раствора ФСБ-Т и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста.

7.1 Подготовка компонентов набора

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от $17 ^\circ\text{C}$ до $27 ^\circ\text{C}$.

7.1.1 Подготовка контрольных образцов

К⁺ и К⁻ готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные К⁺ и К⁻ в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$.

7.1.2 Подготовка рабочего раствора К_г

Из флакона с К_г отобрать указанный на этикетке объем (*V* – объем К_г в мл) и перенести во флакон с РБР-К. Рабочий раствор К_г тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования для постановки ИФА одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимые объемы РБР-К и Кг в соответствии с таблицей 2.

Хранение: рабочий раствор Кг не более 10 мин при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованный Кг в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.3 Приготовление рабочего раствора ТМБ

В случае кристаллизации ТМБ флакон с реагентом выдержать в течение 3 - 5 мин при температуре 37 °С до полного растворения ТМБ.

Рабочий раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием в защищенном от света месте.

Из флакона с ТМБ отобрать указанный на этикетке объем (V) и перенести во флакон с БРС. Раствор осторожно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимые объемы БРС и ТМБ в соответствии с таблицей 2.

Хранение: рабочий раствор ТМБ не более 20 мин при температуре от 17 °С до 27 °С в защищенном от света месте, неиспользованный ТМБ - в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.4 Подготовка РБР-К, РБР-С, БРС

РБР-К, РБР-С, БРС готовы к использованию.

Во флаконах с РБР-К и РБР-С допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном взбалтывании.

Хранение: неиспользованные РБР-К, РБР-С, БРС в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.5 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

При наличии осадка флакон с ФСБ-Т(х25) выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое флакона с ФСБ-Т(х25) перенести в мерный цилиндр, разбавить в 25 раз водой очищенной и тщательно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 2.

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т(х25) в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.6 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: неиспользованный стоп-реагент в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

Т а б л и ц а 2 – Расход реагентов для постановки анализа

Объем	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т												
ФСБ-Т(х25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода очищенная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Приготовление рабочего раствора Кг												
Кг	V/13	2V/13	3V/13	4V/13	5V/13	6V/13	7V/13	8V/13	9V/13	10V/13	11V/13	V
РБР-К, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	13,0
Приготовление рабочего раствора ТМБ												
ТМБ	V/13	2V/13	3V/13	4V/13	5V/13	6V/13	7V/13	8V/13	9V/13	10V/13	11V/13	V
БРС, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	13,0

7.2 Проведение ИФА

7.2.1 Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 17 до 27 °С.

Приготовить рабочий раствор ФСБ-Т, рабочий раствор Кг, вскрыть флаконы с остальными реагентами и контрольными образцами.

В случае постриповой постановки анализа вынуть из пакета и закрепить на рамке необходимое число стрипов планшета. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем. Упакованные стрипы допускается хранить при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности набора реагентов.

Промыть планшет один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить, активно постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.2 В любые две лунки планшета внести по 100 мкл К+, в три другие лунки планшета – по 100 мкл К-. В одну лунку планшета внести 100 мкл РБР-С для контроля конъюгата.

При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- две лунки, для К+ – одну лунку, для контроля Кг – одну лунку.

7.2.3 В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С, затем по 10 мкл исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

7.2.4 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.5 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т, как описано в 7.2.1.

7.2.6 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора Кг (приготовление см. 7.1.2). Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.7 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т, как описано в 7.2.1.

7.2.8 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (приготовление см. 7.1.3).

7.2.9 Планшет поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре от 20 °С до 25 °С.

7.2.10 Остановить реакцию внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности (ОП) растворов в лунках планшета на спектрофотометре при длине волны 450 нм непосредственно после остановки реакции.

Нулевой уровень («бланк») установить по воздуху.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с контролем Кг (ОПК_{гср.}) не превышает 0,150 о.е.;
- в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-ср.) не более 0,200 о.е.;
- в лунках с К+ среднее значение ОП (ОПК+ср.) не менее 1,000 о.е.

Результаты теста считаются положительными, если ОП анализируемой сыворотки больше ОПКрит.

Рассчитать ОПКрит. по формуле 1

$$\text{ОПКрит.} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,2, \quad (1)$$

где (ОПК-ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по трем лункам.

Каждое отдельное значение (ОПК-) не должно отклоняться от среднего значения более чем на 20 %. Если одно из трех значений (ОПК-) выходит за этот предел, его следует исключить из расчета среднего значения. Если исключению подлежит более одного значения (ОПК-), анализ следует повторить.

Рекомендуется соотносить данные серологического обследования с результатами других диагностических методов исследования, направленных на выявление антигенов или антител к *Treponema pallidum*, а также с клинической картиной заболевания и на основании комплексных клинико-лабораторных исследований ставить окончательный диагноз.

Полуколичественный учет результатов

Для определения титра к *Treponema pallidum* в выявленных положительных образцах провести титрование образцов следующим образом.

1) Для титрования каждой пробы использовать отдельный стрип.

Пронумеровано
Прошнуровано
Скреплено печатью
в 6
ЗАФ «МБС» листов.