

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 2007 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
_____ 2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления
суммарных антител к *Treponema pallidum*
(РекомбиБест антипаллидум – суммарные антитела)
комплект 1

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления суммарных антител к *Treponema pallidum* в сыворотке или плазме крови человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 192 (2×96) анализов, включая контроли (по 4 лунки каждого планшета используют для постановки контролей).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на «сэндвич» – варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением рекомбинантных антигенов. При наличии в исследуемых образцах иммуноглобулинов классов G, M и A к *Treponema pallidum* они связываются с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета и входящими в состав конъюгата. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело». Степень окраски прямо пропорциональна концентрации антител к *Treponema pallidum* в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником отделения Т.Г. Вяткиной

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum* – 2 шт;
- положительный контрольный образец (K^+), инаktivированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая антитела к *Treponema pallidum* – 1 фл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инаktivированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, не содержащая антитела к *Treponema pallidum* – 1 фл;
- конъюгат – рекомбинантные антигены *Treponema pallidum*, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – 1 фл. или 2 фл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 3,0 мл;
- разводящий раствор (РР) – 2 фл. по 13,0 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 2 фл. по 13,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 21,0 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП⁺ (рег. № СОП-05-6): чувствительность по антителам к *Treponema pallidum* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП⁺ (рег. № СОП-04-42): специфичность по антителам к *Treponema pallidum* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке 6% - ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр в диапазоне — 620 - 650 нм; или только с фильтром 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшет;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода очищенная;
- 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 5 суток, либо при минус $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифуговать 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Контрольные образцы, концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

Плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник (2-8) °С, использовать в течение 1 мес.

Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор ТМБ.

При промывке лунки планшета заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сывороток.

Перекисью водорода (другие дезинфицирующие растворы не использовать) обрабатывать только наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами. В случае их повторного использования, обеззараживать в 6% перекиси водорода (не менее 6 ч) с последующей 10-кратной промывкой в проточной воде, 3-кратной промывкой в дистиллированной воде и кипячением (40 мин) в последней из 3-х порций дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в слу-

чае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т×25 развести дистиллированной водой до 700 мл.

Хранение: при (2-8)°С до 72 ч.

7.2.2. Контрольные образцы

Растворить контрольный положительный и контрольный отрицательный образцы (K^+ и K^-), добавив в каждый флакон по 200 мкл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: при (2-8)°С до 1 мес.

7.2.3. Растворы конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата можно хранить при температуре (2-8) °С до 1 мес.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием!

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата и внести во флакон с раствором для разведения конъюгата (РР), тщательно перемешать.

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

Во флакон с СБР добавить 650 мкл ТМБ и тщательно взболтать.

Хранение: до 3 ч в защищённом от света месте при (18-25) °С.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), контрольные образцы (п. 7.2.2),

концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3).

Внимание! Промывочный раствор, контрольные образцы и концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °C.

7.3.2. Приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.3).

7.3.3. В 2 лунки планшета внести по 10 мкл положительного контрольного образца (K^+), в 2 лунки – по 10 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в остальные лунки – по 10 мкл цельных испытуемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 90 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора. При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки поверхности лунки и сыворотки, находящейся в ней. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать 60 мин при температуре (37±1) °C.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипа 5 раз промывочным раствором.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Не допускать высыхания лунок планшетов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.5. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении.

Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре (18-25)°C.

7.3.6. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значения ОП в лунках с K^- не более 0,2;
- значения ОП в лунках с K^+ не менее 0,8.

Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если соответствующее ей значение ОП превышает или равно величине $ОП_{крит}$, которую вычисляют по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,2$$

где $ОП_{ср}(K^-)$ — среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Наборы хранить и транспортировать при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

10.2. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

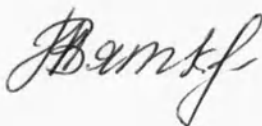
По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 332-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

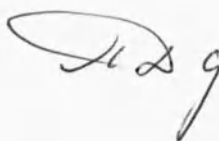
и в Федеральное Государственное Учреждение «Центральный кожно-венерологический институт (ФГУ «ЦНИКВИ Росздрава») (107076, г. Москва, ул. Короленко, д. 3, строение 6, тел. (495)-964-39-17).

Нач. отделения
ЗАО «Вектор-Бест»



Т.Г. Вяткина

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов