



УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« ____ » _____ 2007 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления антител класса IgG к *Treponema pallidum*

«РекомбиБест антипаллидум – IgG»

комплект 1

Комплект 1 набора реагентов «РекомбиБест антипаллидум – IgG» представляет собой диагностический набор реагентов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) на твёрдофазном носителе.

СОСТАВ КОМПЛЕКТА

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum*;
- положительный контрольный образец (K^+), инаktivированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая антитела к *Treponema pallidum* – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инаktivированный – лиофилизированная сыворотка крови здоровых доноров, не содержащая антитела к *Treponema pallidum* – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична;
- конъюгат – козьи антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична;

Взамен инструкции, утвержденной 14.01.2001 г.

Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора,
Руководитель НОК МИБП

« » 2007 г.

Директор
ФГУ «ЦНИКВИ Росздрави»

2007 г.

- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость;
- раствор для разведения сывороток (РС) – непрозрачная жидкость оранжево-красного цвета;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – непрозрачная жидкость светло-серого цвета;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании до температуры (35-37) °С;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость;
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 1 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость.

Активными компонентами набора являются рекомбинантные антигены *Treponema pallidum*, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат (антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена), положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток.

Способ определения IgG к *Treponema pallidum* представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови с иммобилизованными на поверхности лунок планшета рекомбинантными антигенами происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело», который выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Набор рассчитан на проведение 192 (2×96) анализов, включая контроли (по 5 лунок каждого планшета используют для постановки контролей). Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления специфических антител (IgG) к возбудителю сифилиса в сыворотке (плазме) крови и ликворе человека и рекомендуется для диагностики сифилиса.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При подготовке к проведению анализа и его выполнении следует соблюдать меры предосторожности, принятые для работы с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках; не пипетировать растворы ртом; все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующим раствором (например, 6 % раствором перекиси водорода, время экспозиции не менее 6 часов).

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

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

- Желательно использовать свежесобранные образцы сыворотки (плазмы) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2-8) °C не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 3) °C не более 1 месяца.

- Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Поэтому перед постановкой ИФА их следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

- Нельзя использовать сыворотки с признаками микробной контаминации, гемолизированные, гиперлипидные, подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °C.

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

- После постановки реакции плотно закрытые флаконы с оставшимися исходными компонентами следует хранить при температуре (2-8) °C не более 1 месяца.

– Раствор ТМБ и раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Следует исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

– При промывке лунки планшета заполнять полностью (не менее 300 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечниками пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно составлять не менее 30 с.

– При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости с промывочным раствором и соединительных шлангов, не допуская образования в них микробных заростов. Для этого раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70 % этиловым спиртом.

– Нельзя допускать высыхания лунок 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 многократное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

– Наконечники для пипеток, использованные для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами, следует обеззараживать 6 % перекисью водорода в течение 6 часов (другие дезинфицирующие растворы не использовать!). Следует применять пластиковые наконечники однократного использования; в случае повторного применения наконечники следует промыть 10 раз проточной водой, 3 раза дистиллированной водой и прокипятить в течение 40 минут в последней порции дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

– Посуду (пластиковые ванночки), наконечники для пипеток, применяемые для работы с остальными реагентами, нет необходимости обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (пластиковые ванночки), наконеч-

ники для пипеток следует промывать проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

– Для работы с раствором ТМБ рекомендуется выделить отдельную посуду (пластиковые ванночки) и наконечники для пипеток. В случае повторного использования сразу после работы их необходимо промыть 50 % раствором этилового спирта, а затем - дистиллированной водой.

– Пипетки и рабочие поверхности лабораторных столов и приборов следует обрабатывать 70 % раствором этилового спирта. Нельзя использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1.1 Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением при температуре (35-37) °С до полного растворения осадка.

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

Хранение: до 72 ч при температуре (2-8) °С.

1.2 Контрольные образцы

Растворить контрольные образцы K^+ и K^- добавлением в каждый флакон по 200 мкл РПР.

Хранение: до 1 месяца при температуре (2-8) °С.

1.3 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 – до 1 месяца при температуре (2-8) °С.

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

Отобрать из флакона необходимое количество (подбирается производителем для каждой серии наборов и указывается в инструкции, вкладываемой в набор) концентрированного раствора конъюгата и внести во флакон с раствором для разведения конъюгата (РК), тщательно перемешать.

1.4 Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием. Рекомендуется выделять наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В содержимом флакона с СБР растворить 0,65 мл ТМБ, тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света.

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

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

2.1. Приготовить промывочный раствор (п. 1.1), контрольные образцы (п. 1.2), концентрированный раствор конъюгата (п. 1.3).

Все растворы должны быть комнатной температуры (18–25) °С.

2.2. Во все лунки планшета внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РС).

В 2 лунки планшета внести по 10 мкл положительного контрольного образца (К⁺), в 2 лунки – по 10 мкл отрицательного контрольного образца (К⁻), в 1 лунку – 10 мкл РС (контроль конъюгата), в остальные лунки – по 10 мкл цельных испытуемых сывороток. Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать 30 мин при температуре (37±1) °С.

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 1.3.).

2.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором с помощью вошера или вручную (используя многоканальную пипетку).

При этом каждую лунку необходимо заполнять полностью (не менее 300 мкл промывочного раствора).

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 слоёв фильтровальной бумаге.

2.4. В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

2.5. По окончании инкубации промыть лунки 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано выше (п. 2.3).

2.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 1.4).

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ. Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

2.7. Остановить реакцию добавлением в лунки 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.

УЧЁТ 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. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

Результаты исследований учитывать только в том случае, если значения ОП в лунках с контролем конъюгата и K^- не более 0,2, а в лунках с K^+ не менее 0,8.

Исследуемую сыворотку расценивают как положительную, если соответствующее ей значение ОП превышает или равно величине $\text{ОП}_{\text{крит}}$, которую вычисляют по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,2$$

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В ВЫЯВЛЕННЫХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Если необходимо определить титр антител в выявленных положительных образцах, проводят их титрование.

Внести в лунки верхнего ряда планшета (А-1, А-2, ... А-11) по 180 мкл РС. В остальные лунки, кроме лунок 12-го ряда, внести по 100 мкл РС.

Затем в одну лунку верхнего ряда (ряд А) внести 20 мкл образца цельной сыворотки или плазмы. Тщательно перемешать раствор пипетированием, после чего перенести 100 мкл в соответствующую лунку второго горизонтального ряда (ряд В), тщательно перемешать пипетированием и перенести 100 мкл в соответствующую лунку третьего горизонтального ряда (ряд С) и т.д. до 8 ряда. Из лунки 8 ряда (ряд Н) отобрать 100 мкл раствора и слить их в дезинфицирующий раствор. То же проделать с остальными образцами.

Таким образом, в каждом вертикальном ряду получают последовательные 2-кратные разведения образца от 1:10 до 1:1280.

В последнем, 12-ом, вертикальном ряду поставить K^+ и K^- в разведении 1:10 и контроль конъюгата.

Заклеить пленкой планшет и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ C$. Далее проведение анализа осуществлять в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше.

За титр антител к *Treponema pallidum* в образце принимают максимальное разведение образца, при котором регистрируют положительный результат, т.е. ОП образца превышает или равна $ОП_{крит}$ ($ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,2$).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИКВОРА

Исследование ликвора можно осуществлять одновременно с исследованием сывороток. При этом используют разведение 1:1 образца ликвора в РС (в лунку вносят 50 мкл исследуемого образца ликвора и добавляют 50 мкл РС), а при проведении вто-

рой фазы реакции конъюгат необходимо использовать в концентрации, в 4 раза более высокой, чем при исследовании сыворотки или плазмы.

Например: если для анализа сывороток требуется взять α мкл концентрированного раствора конъюгата и смешать с содержимым флакона с РК (см. п. 1.3), то для анализа ликвора следует взять $4 \times \alpha$ мкл концентрированного раствора конъюгата и смешать с содержимым флакона с РК.

Проведение анализа осуществляют в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше. Для контроля качества проведения анализа и расчета ОП_{крит} используют контрольные сыворотки, входящие в состав набора.

Учёт результатов осуществляют в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше.

Титрование ликвора проводят аналогично титрованию сывороток, только в верхнюю лунку вертикального ряда следует внести 100 мкл РС и 100 мкл образца ликвора. Конъюгат используют в той же концентрации, что и для качественного исследования ликвора (см. выше). Учёт результатов осуществляют, как описано выше.

ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект 1 набора «РекомбиБест антипаллидум – IgG» состоит из 11 компонентов, упакованных в коробку:

- Планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum* — 2 шт;
- Положительный контрольный образец (K^+), инактивированный — 1 фл;
- Отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный — 1 фл;
- Конъюгат — 1 фл. или 2 фл;
- Раствор для предварительного разведения (РПР) — 1 фл., 3,0 мл;
- Раствор для разведения сывороток (РС) — 1 фл., 28,0 мл;
- Раствор для разведения конъюгата (РК) — 2 фл. по 13,0 мл;
- Тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат — 1 фл., 1,5 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;
- Стоп-реагент — 1 фл., 21,0 мл.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 12 месяцев.

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

Рекламации на качество набора направлять:

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);

и в адрес предприятия-изготовителя **ЗАО «Вектор-Бест»** (630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Кольцово, АБК, тел. (383)-336-73-46, тел./факс (383) -332-67-49).

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« ____ » _____ 2007 г.

№ _____



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления антител класса IgG к *Treponema pallidum*

«РекомбиБест антипаллидум – IgG»

комплект 2

Комплект 2 набора реагентов «РекомбиБест антипаллидум – IgG» представляет собой диагностический набор реагентов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) на твёрдофазном носителе.

СОСТАВ КОМПЛЕКТА

- планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum*;
- положительный контрольный образец (K^+), инаktivированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая антитела к *Treponema pallidum* – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инаktivированный – лиофилизированная сыворотка крови здоровых доноров, не содержащая антитела к *Treponema pallidum* – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична;
- конъюгат – козьи антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична;

Взамен инструкции, утвержденной 14.01.2001 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора,
Руководитель НОК МИБП

_____ Н.В. Медуницын

«__» _____ 2007 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор
ФГУ «ЦНИКВИ Росздрава»



_____ А. Кубанова

_____ 2007 г.

- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость;
- раствор для разведения сывороток (РС) – непрозрачная жидкость оранжево-красного цвета;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – непрозрачная жидкость светло-серого цвета;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося растворяющегося при нагревании до температуры (35-37) °С;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость;
- концентрат тетраметилбензидина (ТМБ) – прозрачная бесцветная жидкость;
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 1 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость.

Активными компонентами набора являются рекомбинантные антигены *Treponema pallidum*, иммобилизованные в лунках планшета, конъюгат (антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена), положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток.

Способ определения IgG к *Treponema pallidum* представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови с иммобилизованными на поверхности лунок рекомбинантными антигенами происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело», который выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможно проведение 12 независимых постановок ИФА, при каждой из которых 4 лунки используются для постановки контролей. Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления специфических антител (IgG) к возбудителю сифилиса в сыворотке (плазме) крови и ликворе человека и рекомендуется для диагностики сифилиса.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При подготовке к проведению анализа и его выполнении следует соблюдать меры предосторожности, принятые для работы с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках; не пипетировать растворы ртом; все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующим раствором (например, 6 % раствором перекиси водорода, время экспозиции не менее 6 часов).

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

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

– Желательно использовать свежесобранные образцы сыворотки (плазмы) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2-8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ не более 1 месяца.

– Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Поэтому перед постановкой ИФА их следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

– Нельзя использовать сыворотки с признаками микробной контаминации, гемолизированные, гиперлипидные, подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

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

– После постановки реакции плотно закрытые флаконы с оставшимися исходными компонентами следует хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

– Раствор ТМБ и раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Следует исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

– При промывке лунки планшета заполнять полностью (не менее 300 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечниками пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно составлять не менее 30 с.

– При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости с промывочным раствором и соединительных шлангов, не допуская образования в них микробных заростов. Для этого раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70 % этиловым спиртом.

– Нельзя допускать высыхания лунок 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 многократное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

– Наконечники для пипеток, использованные для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами, следует обеззараживать 6 % перекисью водорода в течение 6 часов (другие дезинфицирующие растворы не использовать!). Следует применять пластиковые наконечники однократного использования; в случае повторного применения наконечники следует промыть 10 раз проточной водой, 3 раза дистиллированной водой и прокипятить в течение 40 минут в последней порции дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

– Посуду (пластиковые ванночки), наконечники для пипеток, применяемые для работы с остальными реагентами, нет необходимости обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (пластиковые ванночки), наконеч-

ники для пипеток следует промывать проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

– Для работы с раствором ТМБ рекомендуется выделить отдельную посуду (пластиковые ванночки) и наконечники для пипеток. В случае повторного использования сразу после работы их необходимо промыть 50 % раствором этилового спирта, а затем - дистиллированной водой.

– Пипетки и рабочие поверхности лабораторных столов и приборов следует обрабатывать 70 % раствором этилового спирта. Нельзя использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1.1 Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением при температуре (35-37) °С до полного растворения осадка.

Отобрать необходимое количество (в соответствии с числом используемых стрипов) ФСБ-Т×25 и развести его дистиллированной водой до соответствующего объёма (см. таблицу расхода компонентов) или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: до 72 ч при температуре (2-8) °С.

1.2 Контрольные образцы

Растворить контрольные образцы добавлением во флакон с К+ 200 мкл РПР, а во флакон с К– 400 мкл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: до 1 месяца при температуре (2-8) °С.

1.3 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 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при температуре (2-8) °С.

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

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК).

Затем в пластиковую емкость отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

1.4 Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием. Рекомендуют выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В пластиковую емкость отобрать необходимое количество ТМБ (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света.

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

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, 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 раствора конъюгата в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$\alpha^* =$ _____ мкл

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

2.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы необходимо снять с рамки, поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8) °C до 1 месяца.

Приготовить промывочный раствор (п. 1.1), контрольные образцы (п. 1.2), концентрированный раствор конъюгата (п. 1.3). Все растворы должны быть комнатной температуры (18–25)°C.

2.2. Во все лунки стрипов внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РС).

В 1 лунку внести 10 мкл положительного контрольного образца (K⁺), в 2 лунки – по 10 мкл отрицательного контрольного образца (K⁻), в 1 лунку – 10 мкл РС (контроль конъюгата), в остальные лунки – по 10 мкл цельных испытуемых сывороток. *Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).*

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать 30 мин при температуре (37±1)°C.

За 5-10 минут до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 1.3.).

2.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором с помощью вошера или вручную (используя многоканальную пипетку). При этом каждую лунку необходимо заполнять полностью (не менее 300 мкл промывочного раствора).

Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

По окончании промывки из лунок стрипов необходимо тщательно удалить влагу, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

2.4. В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать 30 мин при температуре (37±1) °C.

2.5. По окончании инкубации промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу из лунок как описано выше (п. 2.3).

2.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 1.4).

Внести в каждую лунку стрипов по 100 мкл раствора ТМБ. Стрипы поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре от (18-25) °С.

2.7. Остановить реакцию добавлением в лунки 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.

УЧЁТ 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. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

Результаты исследований учитывать только в том случае, если значения ОП в лунках с контролем конъюгата и K^- не более 0,2, а в лунке 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:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp}(K^-) + 0,2$$

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В ВЫЯВЛЕННОМ ПОЛОЖИТЕЛЬНОМ ОБРАЗЦЕ

Если необходимо определить титр антител в выявленном положительном образце, проводят его титрование. Параллельно на отдельном стрипе (контрольный стрип) ставят K^+ , K^- в разведении 1:10 и контроль конъюгата (п. 2.2).

В верхнюю лунку стрипа внести 180 мкл РС, в остальные лунки стрипа — по 100 мкл РС. Затем в верхнюю лунку стрипа внести 20 мкл цельной сыворотки или плазмы. Тщательно перемешать раствор пипетированием, после чего перенести 100 мкл во вторую лунку, перемешать пипетированием и перенести 100 мкл в третью

лунку и т.д. до последней лунки стрипа. Из последней лунки отобрать 100 мкл раствора и слить его в дезинфицирующий раствор.

Таким образом, получают последовательные 2-кратные разведения образца от 1:10 до 1:1280. При каждом титровании для контроля качества проведения анализа и расчёта ОП_{крит.} необходимо выполнять постановку контролей (п. 2.2). Закрыть стрипы и инкубировать 30 мин при температуре (37±1) °С. Далее проведение анализа осуществлять в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше.

За титр антител к *Treponema pallidum* в образце принимают максимальное разведение образца, при котором регистрируется положительный результат, т.е. ОП образца превышает или равна ОП_{крит} ($\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(K^-) + 0,2$).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИКВОРА

Исследование ликвора можно осуществлять одновременно с исследованием сывороток. При этом используют разведение 1:1 образца ликвора в РС (в лунку вносят 50 мкл исследуемого образца ликвора и добавляют 50 мкл РС), а при проведении второй фазы реакции конъюгат необходимо использовать в концентрации, в 4 раза более высокой, чем при исследовании сыворотки или плазмы (п. 1.3).

Например: если для анализа сывороток требуется взять α мкл концентрированного раствора конъюгата и смешать с 1 мл РК (см. п. 1.3.), то для анализа ликвора следует взять $4 \times \alpha$ мкл концентрированного раствора конъюгата и смешать с 1,0 мл РК.

Проведение анализа осуществлять в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше. Для контроля качества проведения анализа и расчёта ОП_{крит} использовать контрольные сыворотки, входящие в состав набора.

Учёт результатов осуществлять в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше.

Титрование ликвора проводят аналогично титрованию сывороток, только в верхнюю лунку вертикального ряда следует внести 100 мкл РС и 100 мкл образца ликвора. Конъюгат используют в той же концентрации, что и для качественного исследования ликвора (см. выше). Учёт результатов осуществляют, как описано выше.

ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект 2 набора «РекомбиБест антипаллидум – IgG» состоит из 11 компонентов, упакованных в коробку:

– Планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum* — 1 шт;

- Положительный контрольный образец (K^+), инактивированный — 1 фл;
- Отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный — 1 фл;
- Конъюгат — 1 фл. или 2 фл;
- Раствор для предварительного разведения (РПР) — 1 фл., 3,0 мл;
- Раствор для разведения сывороток (РС) — 1 фл., 13,0 мл;
- Раствор для разведения конъюгата (РК) — 1 фл., 13,0 мл;
- Тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат — 1 фл., 1,5 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) — 1 фл., 28,0 мл;
- Субстратный буферный раствор (СБР) — 1 фл., 13,0 мл;
- Стоп-реагент — 1 фл., 12,0 мл.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора — 12 месяцев.

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

Рекламации на качество набора направлять:

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);

и в адрес предприятия-изготовителя **ЗАО «Вектор-Бест»** (630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Кольцово, АБК, тел. (383)-336-73-46, тел./факс (383) -332-67-49).

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов