

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
антител класса IgM к *Treponema pallidum*
РекомбиБест антипаллидум – IgM

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления IgM к возбудителю сифилиса в сыворотке или плазме крови человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли (по 4 лунки в каждой постановке ИФА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия

Способ определения IgM к *Treponema pallidum* представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого в лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание иммуноглобулинов класса М сыворотки крови с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами против иммуноглобулинов класса М человека. Во время второй инкубации, связавшиеся специфические иммуноглобулины класса М к *Treponema pallidum*, взаимодействуют с добавленными в лунки рекомбинантными белками *Treponema pallidum*, конъюгированными с пероксидазой хрена. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором ТМБ, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окра-

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

ски прямо пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса М к *Treponema pallidum* в анализируемых пробах.

2.2. Состав набора

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

- планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) – сыворотка крови человека, содержащая антитела класса IgM к *Treponema pallidum*, инактивированная прогреванием, лиофилизированная – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична; не содержит HBsAg, антител к ВГС, ВИЧ-1,2, антигена р24 ВИЧ-1 – 1 фл.;
- отрицательный контрольный образец (K^-) – сыворотка крови здоровых доноров, не содержащая антитела к *T. pallidum*, инактивированная прогреванием, лиофилизированная – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична; не содержит HBsAg, антител к ВГС, ВИЧ-1,2, антигена р24 ВИЧ-1 – 1 фл.;
- конъюгат – рекомбинантные антигены *Treponema pallidum*, конъюгированные с пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 3,0 мл;
- раствор для разведения сывороток и конъюгата (РСК) – бледно-серая мутная жидкость – 2 фл. по 13,0 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Тх25) – прозрачная бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании – 1 фл., 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 12,0 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат определения набором иммуноглобулинов класса М к *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП⁺ (рег. № СОП-05-17): чувствительность по антителам к *Treponema pallidum* – 100%.

3.2. Результат определения набором иммуноглобулинов класса М к *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СППГ (рег. № СОП-04-42): специфичность по антителам к *Treponema pallidum* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При подготовке к проведению анализа и его выполнении 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±1) °С;
- 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 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)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

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

Нельзя использовать сыворотки с признаками микробной контаминации, гемолизированные, гиперлипидные 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)°С.

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 «Век-

тор-Бест».

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 случае 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.

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

Хранение: (2-8) °С до 72 ч.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
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
Раствор конъюгата в рабочем разведении												

Концентри- рованный 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 $\times\alpha$
РСК, 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
Раствор ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ, кон- центрат, 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

7.2.2. Контрольные образцы

Растворить контрольный положительный и контрольный отрицательный образцы (K^+ и K^-), добавив во флакон с K^+ 200 мкл РПР, а во флакон с K^- 400 мкл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: (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 (2-8) °С до 1 мес.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения сывороток и конъюгата (РСК).

Затем в пластиковую ванночку отобрать необходимое количество (см таблицу) концентрированного раствора конъюгата (необходимое количество раствора конъюгата зависит от числа используемых стрипов и рассчитывается с использованием коэффициента α , который подбирается производителем для каждой серии наборов и указывается в инструкции, вкладываемой в набор) и добавить соответствующее количество РСК.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

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.

В пластиковую ванночку, в зависимости от числа используемых стрипов (см таблицу), отобрать необходимое количество концентрата ТМБ (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 ч в защищенном 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 (18-25) °С.

7.3.2. В одну лунку планшета внести 10 мкл разведенного положительного контрольного образца (K^+), в две лунки – по 10 мкл разведенного отрицательного контрольного образца, в одну лунку – 10 мкл РСК (контроль конъюгата), в остальные лунки – по 10 мкл цельных испытуемых образцов сыворотки или плазмы. Затем во все лунки добавить по 90 мкл РСК.

Лунки планшета заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при (37±1) °С.

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.3.).

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки планшета 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 слоёв фильтровальной бумаге.

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

7.3.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Заклеить лунки пленкой и инкубировать 30 мин при (37±1) °С.

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

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз промывочным раствором, как описано выше (см п. 7.3.3).

7.3.5. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении.

Во все лунки планшета 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) °С.

7.3.6. 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.

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 АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– в лунках с отрицательным контрольным образцом среднее значение ОП ($ОП_{ср}K^-$) и в лунке с контролем конъюгата значение ОП – не более 0,2;

– в лунке с положительным контрольным образцом значение ОП ($ОП_{ср}K^+$) должно быть выше $ОП_{ср}K^- + 0,2$.

Критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) вычислить по следующей формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} (K^-) + 0,15.$$

Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если значение ОП в соответствующей лунке больше или равно $ОП_{крит}$.

Исследуемую сыворотку расценивать как отрицательную, если значение ОП в соответствующей лунке ниже $ОП_{крит}$.

9.2. Определение титра антител в выявленных положительных образцах

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 (см п.7.3.2).

В верхнюю лунку стрипа внести 180 мкл РСК, в остальные лунки стрипа – по 100 мкл РСК. Затем в верхнюю лунку стрипа внести 20 мкл образца сыворотки. Тщательно переме-

шать 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.

Лунки заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Далее все операции, а также регистрацию результатов провести в соответствии с настоящей инструкцией, как описано выше.

За титр антител к *Treponema pallidum* в образце принимать максимальное разведение образца, при котором регистрируется положительный результат, т.е. ОП образца больше или равна ОП_{крит} (ОП_{крит} = ОП_{ср}(К) + 0,15).

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»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



Вяткина
М.Д. Хусаинов

Т.Г. Вяткина

М.Д. Хусаинов