

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

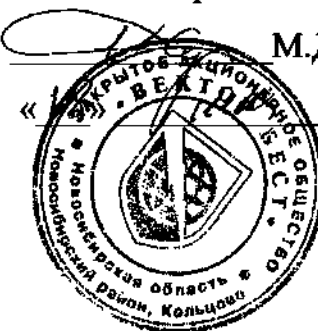
«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ассоциированных с сифилисом
антител к кардиолинину в реакции преципитации

Антикардиолипип-РПР-БЕСТ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Антикардиолипип-РПР-БЕСТ (далее по тексту - набор) предназначен для определения ассоциированных с сифилисом реактивных антител класса IgG и IgM к липидам клеточной оболочки трепонем в сыворотке (плазме) крови или спинномозговой жидкости (ликворе) человека.

Набор реагентов может быть использован для первичного скрининга и наблюдения за эффективностью лечения больных сифилитической инфекцией.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 400 исследований, включая контрольные (с К+ и К- в каждой постановке).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на реакции преципитации (флоккуляции). При добавлении к сыворотке (плазме) крови больного сифилисом или к спинномозговой жидкости больного нейросифилисом суспензии стабилизированного кардиолипинового антигена

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником отделения экспресс-диагностики Н.Ю. Федосовой

(АГк) образуется преципитат (комплексы антиген-антитело), выпадающий в виде хлопьев; результат исследования оценивают визуально.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- антиген кардиолипидный (АГк), готовый для использования – 2 фл. по 4,0 мл;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+), готовый для использования – 2 фл. по 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), готовый для использования – 2 фл. по 2,0 мл;
- тест-карточки для проведения исследования, готовые для использования – 50 шт. (по 8 проб каждая);

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат выявления антител к кардиолипину в K^+ должен быть не менее 3+ (агрегаты частиц синего цвета средней величины).

3.2. Чувствительность на разных стадиях заболевания.

Антифосфолипидные антитела, выявляемые этим тестом, находят у 80-85% пациентов с первичным сифилисом, у 98-100% пациентов с вторичным и ранним латентным (скрытым) сифилисом и у 60-70% пациентов с поздним сифилисом.

3.3. Специфичность.

Специфичность определения «сифилитических реактивов» с помощью кардиолипидного антигена составляет 96%.

3.4. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результатов данного теста составляет 100%.

3.5. Ложные реакции.

Ложноотрицательные результаты могут наблюдаться у пациентов с ранним первичным и поздним латентным сифилисом. У пациентов с вторичным сифилисом встречаются редко (в 1-2% случаев) и могут быть связаны с эффектом «прозопы»: очень высокие титры реактивных АТ в сыворотке крови ингибируют преципитацию комплексов АГ-АТ, поэтому при проверке неразведённой сыворотки иногда получается отрицательный или очень слабый результат; при разведении сыворотки реактивность возрастает.

Ложноположительные результаты.

Антилипидные антитела могут появляться не только вследствие сифилиса или других трепонемных инфекций, но и в ответ на развитие нетрепонемных заболеваний острой или хронической формы, при которых наблюдается повреждение тканей (особенно

А

часто при аутоиммунных заболеваниях). Беременность и наркомания тоже могут дать ложноположительный результат.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом (ГОСТ Р 52905-2007. Требования безопасности для медицинских лабораторий):

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

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

- Холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 15 до 500 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- шейкер орбитального типа, позволяющий производить перемешивание в горизонтальной плоскости с частотой 100 об/мин и амплитудой не менее 20 мм;
- таймер;
- перчатки резиновые хирургические;
- натрий хлористый;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать свежесобранные образцы сыворотки (плазмы) крови или спинномозговой жидкости (ликвор). Допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток, либо при температуре минус 20±3 °C не более 1 месяца.

Образцы сыворотки (плазмы) крови или ликвора, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифуговать 10-15 минут при 1000-2000 об/мин.

Нельзя использовать образцы гемолизированные, гиперлипидные, с признаками бактериального пророста, подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать в течение 30 минут при температуре от 18 до 25 °С.

Сразу после постановки реакции плотно закрытые флаконы с компонентами необходимо поместить в холодильник.

Запрещается повторное использование тест-карточек для проведения исследования.

7.1. Подготовка контрольных образцов

Контрольные образцы (К+ и К-) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.2. Подготовка кардиолипинового антигена

Кардиолипиновый антиген готов к использованию. Перед применением осторожно, но тщательно перемешать до образования гомогенной суспензии.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора во флаконе из темного стекла.

7.3. Подготовка тест-карточек

Готовы к использованию.

Хранение: при температуре от 18 до 25 °С в течение всего срока годности набора.

7.4. Проведение качественного теста

Для каждого исследуемого и контрольного образца использовать по одной лунке тест-карточки.

7.4.1. На поверхность одной из лунок тест-карточки автоматической пипеткой нанести 40 мкл положительного контрольного образца и равномерно распределить объём по всей поверхности лунки наконечником пипетки.

На поверхность другой лунки точно так же нанести 40 мкл отрицательного контрольного образца.

На поверхность остальных лунок - по 40 мкл исследуемых образцов.

Внимание! Для каждого образца использовать отдельный наконечник для пипетки.

7.4.2. В каждую лунку с контрольными или исследуемыми образцами добавить пипеткой по 15 мкл гомогенной суспензии кардиолипинового антигена (АГк). Вносить АГк осторожно (каплей), не касаясь наконечником пипетки поверхностей лунок с образцами.

7.4.3. После внесения реагентов инкубировать содержимое лунок в течение 8 мин при температуре от 18 до 25 °С, поместив карточки на горизонтальную поверхность шейкера при скорости вращения ротора 100 об/мин.

7.4.4. По окончании инкубации произвести учет результатов в соответствии с разделами 8, 9.

7.5. Проведение полуколичественного теста (определение титра реактивных антител).

7.5.1. В лунки № 1–4 тест-карточки автоматической пипеткой нанести по 40 мкл 0,9% раствора NaCl для одного исследуемого образца.

7.5.2. В лунки № 1 добавить 40 мкл исследуемого образца и, используя тот же наконечник, перемешать при помощи осторожного пипетирования. Затем перенести 40 мкл смеси из лунки № 1 в лунку № 2, а оставшуюся в лунке № 1 смесь равномерно распределить наконечником пипетки по всей поверхности.

7.5.3. Перемешать разведение исследуемого образца в лунке № 2 пипетированием и перенести 40 мкл смеси в лунку № 3, а оставшуюся в лунке № 2 разведение равномерно распределить наконечником пипетки по всей поверхности лунки.

7.5.4. Повторить процедуру, описанную в п. 7.5.3, до лунки № 4, из которой удалить 40 мкл смеси. Оставшуюся смесь равномерно распределить наконечником пипетки по поверхности лунки. Полученные разведения исследуемого образца будут соответствовать:

- в лунке № 1 — 1:2;
- в лунке № 2 — 1:4;
- в лунке № 3 — 1:8;
- в лунке № 4 — 1:16.

7.5.5. В каждую лунку добавить пипеткой по 15 мкл гомогенной суспензии АГк, как описано в п. 7.4.2.

7.5.6. Содержимое кругов инкубировать, как описано в п. 7.4.3.

7.5.7. Сразу же по окончании срока инкубации провести учёт результатов (см. п. 7).

Внимание! Если в полуколичественном тесте при с разведением 1:16 исследуемого образца получен положительный результат исследования, то проводят дополнительное исследование его последующих 2-кратных разведений.

В качестве растворителя для приготовления последующих разведений исследуемого образца следует использовать отрицательный контрольный образец (K^-), разведённый в 50 раз в 0,9% растворе хлористого натрия (10 мкл K^- + 490 мкл 0,9% раствора NaCl).

Исследуемый образец необходимо сначала развести данным раствором в 16 раз (10 мкл образца + 150 мкл раствора K^-). Затем выполнить процедуры, описанные в п. 7.5, используя вместо 0,9% раствора NaCl приготовленное разведение K^- .

Полученные разведения исследуемого образца будут соответствовать:

- в лунке № 1 — 1:32;

- в лунке № 2 — 1:64;
- в лунке № 3 — 1:128;
- в лунке № 4 — 1:256.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты оцениваются визуально.

9. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Учёт результатов качественного теста

Учёт результатов проводят визуально в условиях хорошей освещённости сразу же по окончании инкубации. При более позднем считывании возможна неспецифическая агглютинация. Результаты исследования должны учитываться в сравнении с тем, что наблюдается в лунках с K^+ и K^- :

- K^- — гомогенная суспензия синего цвета, отсутствие видимой преципитации частиц;
- K^+ — отчётливые преципитаты частиц синего цвета (реакция не менее 3+).

Положительный результат исследования – в лунке присутствуют преципитаты частиц разной величины синего цвета, величина которых оценивается в условных единицах - «плюсах» (4+ – крупные, 3+ – средние, 2+ – мелкие); одновременно наблюдается просветление общего фона реакционной среды.

Отрицательный результат исследования – в лунке присутствует однородная суспензия частиц синего цвета; преципитация частиц отсутствует.

9.2. Учёт результатов полуколичественного теста

При полуколичественном исследовании титром антител к кардиолипиновому антигену считается наибольшее разведение исследуемого образца, при котором наблюдается положительный результат.

Положительный результат РПР-теста не является основанием для постановки диагноза сифилитической инфекции. Исследуемые образцы, дающие положительные результаты, подлежат дальнейшему исследованию в специфических трепонемных серологических реакциях на сифилис (ИФА, РИГА, РИФ, иммуноблоттинг и другие).

Handwritten signature or mark.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в вертикальном положении. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

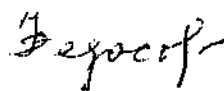
По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 332-92-49, 227-60-30, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44; e-mail: plkobtk@vector-best.ru;

и в Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздравсоцразвития России (ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России) (107076, г. Москва, ул. Короленко, д. 3, строение 6, тел. (499)-785-20-16); e-mail: info@cnikvi.ru.

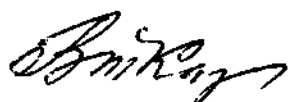
Нач. отделения экспресс-диагностики

ЗАО «Вектор-Бест»

 Н.Ю. Федосова

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

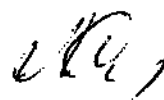
 В.К. Ткачев

Начальник Управления по науке,

инновациям и информатизации

ГБОУ ВНО НГМУ

Минздравсоцразвития России

 М.Ф. Осипенко

