

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2012 г. № _____

«УТВЕРЖДЕНО»

Генеральный директор

ООО «Фактор-Мед. Инновации»

Н.П. ДУДИН

«16.07.2012»

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для
иммуноферментного определения
антител к *Treponema pallidum*
(ИФА-анти-ТП-ФАКТОР).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор предназначен для исследования сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител классов IgG и IgM к *Treponema pallidum* методом иммуноферментного анализа.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА.

Принцип анализа основан на методе твердофазного непрямого иммуноферментного анализа.

При внесении в лунки образцов исследуемых сывороток антитела классов IgG и IgM, специфические к *Treponema pallidum*, в случае их наличия, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи конъюгата. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор проявителя. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при двухволновом режиме (450 нм и 620 нм), которая пропорциональна концентрации специфических к *Treponema pallidum* антител в образцах сывороток или плазмы крови.

Чувствительность тест-системы при ее проверке на панели сывороток, содержащих антитела к *T. pallidum*, составляет 100%.

Специфичность тест-системы при ее проверке на панели сывороток, не содержащих антитела к *T. pallidum*, составляет 100%.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 и 620 нм.
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА (комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов);
- спирт этиловый, 70°;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- пипетки одноканальные (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) и наконечники к ним;
- пипетки 8-канальные (50-300 мкл) и наконечники к ним;
- мерный стакан или цилиндр (1000 мл);

- ванночки для реагентов;
- флаконы для реактивов, 20 мл;
- термостат на (37 ± 2) °C;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- контейнер для твердых загрязненных отходов;
- контейнер для загрязненных жидкостей.

СОСТАВ НАБОРА.

Компонент	480 анализов	192 анализа	96 анализов
Иммуносорбент Полистироловый планшет, в лунках которого сорбированы рекомбинантные белки Trp 15, Trp 17, Trp 41 и Trp 47 – аналоги антигенов <i>T. pallidum</i>	5	2	1
Концентрат конъюгата (11х) Смесь моноклональных антител к иммуноглобулинам классов IgG и IgM человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. Красная слегка опалесцирующая жидкость	1×7 мл	2×1,5 мл	1×1,5 мл
Положительный контроль Очищенные иммуноглобулины человека, специфические к <i>T. pallidum</i> . Светло-желтая слегка опалесцирующая жидкость	1×1мл	1×1мл	1×1мл
Отрицательный контроль Инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая антител к <i>T. pallidum</i> , ВИЧ1 и ВИЧ2 и вирусу гепатита С, а также поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Светло-желтая слегка опалесцирующая жидкость	1×1,5 мл	1×1 мл	1×1 мл
Концентрат промывочного раствора (26х) Концентрат фосфатно-солевого буфера, содержит детергент. Бесцветная опалесцирующая жидкость, допускается расслоение и выпадение кристаллического осадка, который растворяется при нагревании	2×140мл	1×140мл	1×90 мл
Раствор для разведения сывороток Фосфатно-солевой буфер, содержит детергент, казеиновую фракцию белков молока, блок-компоненты, краситель и консерванты. Фиолетовая опалесцирующая жидкость	1×60 мл	1×25 мл	1×15 мл
Раствор для разведения конъюгата Фосфатно-солевой буфер, содержит детергент, казеиновую фракцию белков молока, блок-компоненты, краситель и консерванты. Красная опалесцирующая жидкость	1×70 мл	1×30 мл	1×15 мл
ТМБ субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в растворе, содержащем перекись водорода. Прозрачная бесцветная жидкость	1×60 мл	1×28 мл	1×14 мл
Стоп-реагент Раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость	1×60 мл	1×28 мл	1×14 мл
Клейкая пленка	15 шт.	6 шт.	3 шт.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА.

1. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории.
2. При работе с набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток, так как образцы сыворотки или плазмы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.
3. Все промывные растворы собираются в специальный контейнер и обрабатываются дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, в концентрации и с экспозицией, указанных в инструкциях к применению.
4. Все твердые отходы собираются в специальный контейнер, обеззараживаются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
5. Лабораторная посуда многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, обеззараживаются с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.
6. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70° раствором этилового спирта.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ.

1. Не использовать набор после окончания срока годности.
2. Не смешивать компоненты наборов разных серий.
3. Тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.
4. Использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой.
5. Не допускать высыхания лунок на всех этапах постановки ИФА.
6. Использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
7. Исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования.
8. Не допускать присутствия паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении ИФА.

ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВКЕ.

1. Процедуру промывки необходимо выполнять в соответствии с требованиями инструкции к набору. Некачественное промывание планшета может привести к получению некорректных результатов.
2. Промывку планшета рекомендуется проводить с использованием вошера. В случае отсутствия вошера допускается промывка лунок 8-канальной пипеткой.
3. Режим промывки планшета: 4 раза промывочным раствором и 2 раза дистиллированной водой.
4. Требования к качеству промывки:
 - заполнять лунки промывочным раствором в объеме не менее 350 мкл в лунку;
 - не допускать переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;

- время экспозиции промывочного раствора в лунке не менее 40 секунд;
- полностью удалять содержимое лунок;
- по окончании промывки остатки жидкости удалить, перевернув планшет и постукивая им по фильтровальной бумаге.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.

1. Образцы сыворотки или плазмы крови хранить при температуре 2-8° С не более 72 часов.
2. Допустимо замораживание образцов для более длительного хранения (температура - 20°С и ниже) не более двух раз.
3. Перед проведением исследования образца, подвергнутого замораживанию, его следует тщательно перемешать.
4. Образцы сыворотки (плазмы), содержащие агрегаты и осадок, осветлять с помощью центрифугирования.
5. Образцы с гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом, а так же содержащие азид натрия, исследованию не подлежат.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.

Компоненты набора и анализируемые образцы крови должны быть выдержаны при комнатной температуре (18-25)°С в течение времени не менее 30 минут до начала анализа и оставаться при указанной температуре в течение постановки анализа.

После использования компоненты набора следует хранить при температуре 2-8° С.

Иммуносорбент.

Извлеките необходимое количество стрипов из упаковки, вставьте их в рамку. Неиспользованные стрипы поместите в пакет, плотно закройте его. Стрипы можно хранить при (2-8) °С не больше 30 дней.

Промывочный раствор.

Содержимое одного флакона концентрата промывочного раствора интенсивно взболтайте. Если концентрат раствора содержит кристаллы, прогрейте его при (35-37) °С до полного растворения кристаллов. Разведите концентрат раствора (26х) дистиллированной водой (см. таблицу), перемешайте.

Количество лунок	Дистиллированная вода, мл	Концентрат промывочного раствора, мл
8	175	7
16	275	11
32	375	15

Промывочный раствор стабилен в течение 10 дней при (2-8)°С.

Раствор конъюгата.

Разведите концентрат конъюгата №1 (11х) раствором для разведения конъюгата в чистом флаконе (см. таблицу). Тщательно перемешайте, не допуская пенообразования.

Количество лунок	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат конъюгата, мкл
8	1	100
16	2	200
32	4	400

Раствор готовят непосредственно перед использованием, остатки раствора не хранят.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

- Подготовьте планшет с необходимым количеством стрипов.
 - Внесите в лунки по 80 мкл раствора для разведения сывороток
 - Внесите исследуемые сыворотки и контроли:
 - в лунки A1-B1 – по 20 мкл положительного контроля.
 - в лунки C1-E1 – по 20 мкл отрицательного контроля.
 - в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых сывороток.
- Осторожно пипетируйте смесь в лунках (во время пипетирования происходит изменение цвета раствора).*
- Накройте планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 60 минут.
 - Промойте планшет 4 раза промывочным раствором (как описано в п. Требования к промыванию).
 - Внесите в лунки по 100 мкл раствора конъюгата.
 - Накройте планшет новой клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут.
 - Промойте планшет 6 раз промывочным раствором (как описано в п. Требования к промывке).
 - Внесите в лунки по 100 мкл ТМБ субстрата.
 - Накройте планшет новой клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$ в темном месте в течение 30 минут.
 - Внесите в лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки цветной реакции (в той же последовательности внесения, что и ТМБ субстрат).
 - Не более чем через 5 минут после остановки цветной реакции измерьте оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм). Визуальный учет результатов не допускается.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

- Рассчитайте среднее значение оптической плотности (ОП) отрицательного контроля – OK_{cp} .
Исключите значения ОК, которые больше 0,1 или более чем в два раза превышают OK_{cp} .
Рассчитайте OK_{cp} по оставшимся значениям ОК.
- Проведение анализа считают достоверным, если OK_{cp} не больше 0,1, а ОП положительного контроля не меньше 0,6.
- Рассчитайте граничное значение (ГЗ), прибавляя константную величину к OK_{cp} .
 $ГЗ = OK_{cp} + 0,12$
- Результат анализа считается отрицательным, если ОП исследуемого образца меньше ГЗ.
- Результат анализа считается положительным, если ОП исследуемого образца больше ГЗ.
- Образцы, давшие положительный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках тест-системы:
 - образцы положительные в одной или более лунках считают положительными;
 - образцы отрицательные в двух или более лунках считают отрицательными.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Диагностический набор хранить и транспортировать при температуре (2-8)°С. Замораживание не допускается. Возможно хранение и транспортирование при температуре (9-20)°С в течение семи суток и при температуре (21-28)°С в течение трех суток.

Срок годности набора – 14 месяцев.

Промывочный раствор, приготовленный для использования, можно хранить при температуре 2-8 °С не более 10 дней.

Приготовленный для использования раствор конъюгата хранению не подлежит.

Остальные компоненты набора можно хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам качества набора ИФА-анти-ТП-ФАКТОР обращаться в ООО «Фактор-Мед Продакшн» по адресу:

119334, г. Москва, 5-ый Донской п-д., д. 15, тел/факс (495) 661-70-82.

E-mail: info@faktor.ru

«СОГЛАСОВАНО»

ГАУЗ КО «Калужский областной
Центр по профилактике и борьбе
со СПИДом и инфекционными заболева-
ниями»

Главный врач: Н. Алешина

Зав. лабораторией: А.И. Мухина

«12» 2012 г.

Инструкцию составил:

Зав. производством
ООО «Фактор-Мед Продакшн»



Бурданов В.Н.

2012 г.

Пронумеровано, прошнуровано
и скреплено печатью

(10002) листов.

Ген. директор



Г.А. Бухартев



Дата

20.04.2022

