

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от « » 200 г. №



В.Г. Нестеренко

«25» 11 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

Набора реагентов «ИННО-ЛИА Сифилис усовершенствованный»
для подтверждения наличия антител к антигенам *Treponema pallidum*
в сыворотке или плазме крови человека
методом линейного иммуноферментного анализа

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ИННО-ЛИА Сифилис усовершенствованный» предназначен для подтверждения наличия антител против *Treponema pallidum* в образцах сыворотки или плазмы крови человека методом линейного иммуноферментного анализа (линейным иммуоблоттом).

Набор используется как дополнительный при исследовании образцов сыворотки или плазмы крови человека, показавших при скрининге (в РПР, РПГА или ИФА) положительный результат.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Три рекомбинантных белка TrpN47, TrpN17, TrpN15 и синтетический пептид TrpA, представляющие собой антигенные детерминанты *Treponema pallidum*, нанесены в виде отдельных линий на мембрану из нейлона, которая

прикреплена к пластиковой подложке, что вместе образует тест-полоску. Антитела к *Treponema pallidum* обнаруживаются по их связыванию с антигенами TrN47, TrN17 и TrN15 и TmpA, нанесенными на тест-полоску в виде отдельных линий. На каждую тест-полоску также нанесены четыре контрольных линии: анти-стрептавидиновая линия (иммобилизованный стрептавидин); линия, по интенсивности окрашивания соответствующая 3+ положительному контролю (иммобилизованные антитела к Ig человека), которая также является контролем внесения образца; линия, по интенсивности окрашивания соответствующая 1+ положительному контролю (иммобилизованные IgG человека); линия, по интенсивности окрашивания соответствующая критическому уровню $\pm$ (иммобилизованные IgG человека).

Набор реагентов «ИННО-ЛИА Сифилис усовершенствованный» основан на принципе иммунного анализа. Тестируемый образец инкубируется в ванночке вместе с тест-полоской. Специфические антитела, если они присутствуют в образце, связываются с антигенами, нанесенными на тест-полоску. Затем в ванночку вносятся козы антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой. Эти антитела связываются с любым образовавшимся комплексом «антиген *Treponema pallidum* – антитело», который сформировался на полоске на предыдущем этапе ИФА-реакции. Инкубация тест-полоски с хромогеном дает темно-коричневый цвет на тех линиях, где присутствуют специфические антитела (с интенсивностью пропорционально количеству антител). Развитие окраски останавливают добавлением серной кислоты.

В случае, если тестируемый образец не содержит специфических антител, изменения окраски полос с нанесенными антигенами TrN47, TrN17 и TrN15 и TmpA не происходит: комплекс «антиген *Treponema pallidum* – антитело» на полосках не образуется, и антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой, не могут с ним связаться.

2.2. Состав набора

- Иммуносорбент – тест-полоски ИННО-ЛИА Сифилис с нанесенными антигенами, 20 шт. 1 пр.
- К+ – положительный контрольный образец, инактивированный – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела к антигенам *Treponema pallidum* с 0,01 % метилизотиазолоном / 0,1 % хлорацетамидом в качестве консерванта, 120 мкл 1 фл.
- К- – отрицательный контрольный образец, инактивированный – нормальная сыворотка крови человека с 0,01 % метилизотиазолоном / 0,1 % хлорацетамидом в качестве консерванта, 120 мкл 1 фл.
- Конъюгат – козьи антитела к IgG человека, (красного цвета) меченные щелочной фосфатазой, в трис-буферном растворе, содержащем стабилизаторы белков бычьего происхождения, детергент и 0,01% метилизотиазолон / 0,1 % хлорацетамид (САА) в качестве консерванта, 45 мл 1 фл.
- Хромоген – 5-бромо-4-хлоро-3-индолилфосфат/ нитротетразолиум голубой в диметилформамиде, 0,01 % метилизотиазолон / 0,1 % хлорацетамид в качестве консерванта, 45 мл 2 фл.
- Раствор для разведения образцов – фосфатный буфер (зеленого цвета), содержащий хлорид натрия, детергент, стабилизаторы белков бычьего происхождения и 0,3 % хлорацетамид в качестве консерванта, 30 мл 1 фл.
- Отмывающий раствор, 5-кратный – фосфатный буферный раствор, содержащий хлорид натрия, детергент, 0,02 % бромонитродидоксан в качестве консерванта (голубого цвета), 45 мл 1 фл.
- Стоп-реагент – 0,1 % серная кислота, 45 мл 1 фл.
- Рамка с ванночками для инкубации тест-полосок, содержит 12 ванночек для инкубации тест-полосок 2 шт.

- Пластины липкие	5 шт.
- Трафарет-схема	1 шт.
- Форма для учета результатов теста	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор предназначен для проведения лабораторных исследований *in vitro* и рассчитан на 20 определений, включая контрольные.

3.1. Чувствительность набора – 100%. Набор должен выявлять все сыворотки стандартной панели, содержащие антитела к *Treponema pallidum* (внутрипроизводственная панель фирмы «ИННОДЖЕНЕТИКС Н.В., разработанная с использованием панели BBI (PSS201)).

3.2. Специфичность набора – 100%. Набор не должен давать ложноположительных результатов при исследовании сывороток, не содержащих антитела к *Treponema pallidum* (внутрипроизводственная панель фирмы «ИННОДЖЕНЕТИКС Н.В., разработанная с использованием панели BBI (PSS201)).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

Все компоненты крови и биологические материалы должны рассматриваться как потенциально инфицированные. К проведению анализа следует допускать только специально обученный персонал. Обработка и утилизация образцов сывороток (плазмы) крови человека и других компонентов

или отходов после завершения анализа должна проводиться в строгом соответствии с установленными нормами безопасности:

- Автоклавирование в течение 60 мин при 121 °C;
- Сжигание;
- Смешение жидких отходов с раствором натрия гипохлорита (конечная концентрация натрия гипохлорита должна быть равна $\pm 1\%$). Оставить на ночь (16 ± 2 ч) до утилизации.

ВНИМАНИЕ!: Нейтрализуйте жидкие отходы, которые содержат кислоту, перед добавлением натрия гипохлорита 1 % раствором щелочи NaOH.

Используйте индивидуальные защитные средства (перчатки и защитные очки) при работе с инфекционными материалами.

Не сливайте стоп-реагент в сосуд с жидкими отходами, который содержит натрия гипохлорит.

Предупреждение:

1. Не используйте набор, если его срок годности истек.
2. Не используйте в одной постановке компоненты из наборов разных серий.
3. Подвергшиеся замораживанию реагенты могут давать ложные результаты.
4. Убедитесь в том, что для проведения анализа был выбран нужный объем образцов и схема отмывки.
5. Избегайте микробиологической контаминации реагентов.
6. Убедитесь, что образцы и контроли, взятые для анализа, гомогенны.
7. Не касайтесь нитроцеллюлозной мембраны тест-полоски, всегда манипулируйте тест-полоской, держа ее за пластиковую подложку.
8. Используйте новый наконечник для пипетки при отборе каждого нового образца.

9. Убедитесь, что тест-полоска помещена в ванночку мембраной вверх (при этом номер на тест-полоске должен быть ясно виден).

10. Все этапы инкубации проводите при помощи миксера с орбитальным вращением или миксера-качалки (см. Указания по процедуре инкубации).

11. В ходе инкубации поверхность тест-полоски должна быть полностью покрыта жидкостью. Это важно для достижения равномерной окраски линий что обеспечивает максимальную чувствительность анализа.

12. Накрывайте ванночки специальной липкой пластиной для избежания высыхания образцов.

13. Не использованные и проявленные тест-полоски должны храниться вдали от источников яркого света и тепла.

14. Данный набор может быть использован только квалифицированным персоналом, обученным в области клинической лабораторной практики.

15. Не используйте тест-полоски и ванночки повторно.

16. Разрезание полосок может привести к недостоверным результатам.

17. После реакции тест-полоски должны быть полностью высушены, чтобы избежать неправильной интерпретации результатов, которая возможна из-за слабо видимых линий, появляющихся после внесения стоп-реагента.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ (необходимые, но не поставляемые)

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Прецизионные пипетки на 10 μ l, 20-200 μ l и 200-1000 μ l с одноразовыми наконечниками.
- Орбитальный шейкер или ротатор (см. Указания по процедуре инкубации).
- Вортекс или другой аналогичный встряхиватель.
- Мерные цилиндры: 25, 50, 100 и 200 мл.
- Пинцет для работы со стрипами.

- Перчатки.
- Таймер (1ч, разрешение – 1 мин).
- Дополнительные материалы:
 - фен или воздушный инкубатор на 37 °С;
 - пипетка-дозатор для дозирования стоп-реагента, конъюгата, хромогена и отмывающего раствора, а также одноразовые флаконы;
 - вакуумный аспиратор, содержащий 5 % гипохлорит натрия;
 - одноразовые флаконы для приготовления рабочих растворов конъюгата и хромогена.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Сбор образцов

Сыворотка и плазма крови должны отбираться таким образом, чтобы исключить возможность гемолиза. Мутные образцы или образцы, в которых содержатся твердые частицы, следует центрифугировать перед проведением теста, чтобы исключить возможность получения ошибочных результатов.

ПРИМЕЧАНИЕ:

- Для получения плазмы крови рекомендуется использовать ЭДТА-содержащие пробирки/вакутайнеры.

6.2. Хранение образцов

- Образцы сыворотки и плазмы, взятые менее, чем за 7 суток до тестирования, следует хранить при температуре 2-8 °С. При хранении образцов более 7 суток их следует заморозить (при температуре -20 °С и ниже).
- Избегайте многократного замораживания и оттаивания. Не используйте образцы, замороженные и оттаянные более 3 раз.
- Не используйте образцы, подвергшиеся тепловой обработке.

- Перед хранением сыворотка или плазма должны быть отделены от кровяного сгустка или клеток крови центрифугированием.
- Набор реагентов «ИННО-ЛИА Сифилис усовершенствованный» можно использовать для тестирования сыворотки или плазмы крови человека, находящихся в пробирках, содержащих цитрат, гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянта.
- Любое предварительное разведение исследуемых образцов можно делать с использованием нормальной сыворотки человека.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Прежде чем приступить к работе, пожалуйста, ознакомьтесь с разделом «Замечания по процедуре тестирования».

1. Используйте рамку с необходимым количеством ванночек, учитывая, что при каждой постановке должны быть использованы положительный и отрицательный контроли. Ванночки можно идентифицировать по маркировке на одном из концов.

2. Внесите 1 мл раствора для разведения образцов в каждую ванночку.

3. Внесите по 10 мкл образцов или контроля в соответствующие ванночки.

4. Возьмите необходимое количество тест-полосок ИННО-ЛИА Сифилис и опустите по одной в каждую ванночку, мембраной вверх с помощью пинцета.

Тест-полоски должны быть полностью погружены в жидкость.

5. Закройте ванночки липкой пластиковой пластиной. Инкубируйте образцы в течение ночи (16 ± 2 часа) при температуре от 18 до 25 °C на орбитальном шейкере или ротаторе (см. раздел «Процедура инкубации»). Осторожно снимите пластиковую пластину с ванночек после окончания инкубации.

6. Отмойте каждую тест-полоску по 3 раза 1 мл рабочего отмывающего раствора, каждая отмывка длится 5 мин (см. раздел «Процедура отмывки»).
7. Внесите по 1 мл раствора конъюгата в каждую ванночку.
8. Инкубируйте в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °C на орбитальном шейкере или ротаторе.
9. Отмойте каждую тест-полоску по 3 раза 1 мл рабочего отмывающего раствора, каждая отмывка длится 5 мин (см. раздел «Процедура отмывки»).
10. Внесите по 1 мл хромогена в каждую ванночку.
11. Инкубируйте в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °C на орбитальном шейкере или инкубаторе-встряхивателе.
12. Удалите жидкость из ванночек. Добавьте по 1 мл стоп-реагента в каждую ванночку.
13. Инкубируйте ванночки со стоп-реагентом в течение 10-30 мин при температуре от 18 до 25 °C на орбитальном шейкере или инкубаторе-встряхивателе.
14. Удалите стоп-реагент из ванночек.
15. Выньте тест-полоски из ванночек с помощью пинцета и положите их мембраной вверх на фильтровальную бумагу. Результаты учитывают после того, как тест-полоски полностью высохнут. Не прикрепляйте тест-полоски к бумаге скотчем за мембрану. Для ускорения высыхания положите тест-полоски в воздушный инкубатор (37 °C) на 30 мин или используйте фен в течение 1 мин. Использованные тест-полоски сохраняют свой цвет, если их хранить в темноте.

Процедура отмывки

После ночной инкубации тщательно удалите липкую пластину. Тщательно удалите жидкость из ванночки.

Держите рамку под углом, чтобы вся жидкость стекла в ту сторону ванночки, где находятся не покрытые мембраной пластиковые «основы» стрипов.

Удалите жидкость пипеткой (предпочтительнее пользоваться вакуумным аспиратором).

Добавьте 1 мл рабочего отмывающего раствора в каждую ванночку и перемешивайте содержимое ванночки в течение 5 мин, используя орбитальный шейкер.

Удалите жидкость пипеткой, держа ванночку под углом, как описано выше.

Повторите эту процедуру 3 раза.

Замечания:

- Не позволяйте тест-полоскам высыхать между этапами процедуры отмывки.
- Убедитесь, что при аспирации не происходит нарушения целостности мембраны тест-полосок.
- Во избежание перекрестной контаминации всегда используйте чистое аспирирующее оборудование с сосудом-ловушкой, содержащим дезинфицирующий раствор.
- Во время процедуры отмывки следите, чтобы тест-полоска была полностью погружена в отмывающий раствор.
- Если это необходимо, регулируйте скорость вращения орбитального шейкера или ротатора.
- Избегайте разбрызгивания отмывающего раствора через края ванночек.

Процедура инкубации

Всегда добавляются объемы, которые указаны в разделе «Проведение анализа». Добавление избытка реактивов может привести к расплескиванию жидкости через края ванночек и вызвать перекрестную контаминацию.

Скорость, развиваемая орбитальным шейкером или ротатором, является критичной для достижения эффективного окрашивания линий и достижения максимальной чувствительности анализа.

Все этапы инкубации тест-полосок (с образцом, конъюгатом, хромогеном и стоп-реагентом), а также этапы отмывки должны производиться на орбитальном шейкере или ротаторе.

Во время инкубации или отмывки тест-полоска должна быть полностью погружена в жидкость мембраной вверх.

Орбитальный шейкер или ротатор должен перемешивать содержимое ванночки таким образом, чтобы тест-полоска двигалась в ванночке «туда-сюда», а жидкость омывала тест-полоску, но не переливалась через край ванночки.

Рекомендации для кругового шейкера и ротатора

Для орбитального шейкера:

- диаметр кругового движения должен быть равным или большим 13 мм.
- рекомендуемая скорость для движения с эксцентриситетом 13 мм должна быть 160 об/мин.

- рекомендуемая скорость для движения с эксцентриситетом 24 мм должна быть 90 об/мин.

Для ротатора:

- амплитуда качания должна быть не больше 11 мм, чтобы предотвратить переливания жидкости.
- рекомендуемая скорость - 35 об/мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

8.1. Контроль качества

Для обеспечения надежности результата анализа тест-полоска включает окно процедурного контроля, помеченное «Control». Если по окончании процедуры контрольная линия не окрашивается в красный цвет, полученный результат недостоверен и необходимо провести повторный анализ.

8.2. Учет результатов

Уровень интенсивности окраски антигенных линий может меняться от «-» до «4+». Для качественной оценки интенсивности окраски антигенных линий проводят сравнение с интенсивностью окраски контрольных линий. Расположение и идентификация антигенов и контрольных линий на тест-полоске даны в таблице (расположение указанных линий на тест-полоске сверху вниз).

Идентификационный номер тест-полоски
Стрептавидин
Антитела к IgG человека, уровень интенсивности окраски соответствует 3+
IgG человека, уровень интенсивности окраски соответствует 1+
IgG человека, уровень интенсивности окраски соответствует ±
TrpN47
TrpN17
TrpN15
TrpA

Интенсивность реакции на контрольных линиях каждой тест-полоски используется для оценки реактивности для каждого антигена на данной тест-полоске.

Для облегчения оценки результата прилагается специальная форма для учета результатов.

Интенсивность реакции антигенных линий (R)		Оценка (уровень)
Менее интенсивная, чем ±	$R < \pm$	-
Интенсивность, равная ±	$R = \pm$	±

Более интенсивная, чем $\pm$, но менее интенсивная, чем 1+ или равная ей	$\pm < R < 1+$	1+
Более интенсивная, чем 1+, но менее интенсивная, чем 3+	$1+ < R < 3+$	2+
Интенсивность, равная 3+	$R = 3+$	3+
Более интенсивная, чем 3+	$R > 3+$	4+

Проявленные тест-полоски прикрепляются к форме для учета результатов так, чтобы контрольные линии интенсивности 3+ у всех тест-полосок и соответствующая линия на рисунке формы были на одном уровне.

Перед считыванием результатов образцов оценивают правильность постановки, используя результаты контрольных тест-полосок (К+ и К-) и контрольных линий на каждой тест-полоске.

8.3. Валидация

Результаты на отдельной тест-полоске можно учитывать, если:

- Контрольные линии интенсивностей $\pm$, 1+, 3+ ясно различимы.
- Интенсивность контрольной линии 3+ больше, чем линии 1+, а интенсивность 1+ линии, больше, чем линии $\pm$.
- Контрольная линия стрептавидина не окрашена.

Примечание: Слабое окрашивание контрольной линии может наблюдаться в образцах с высоким содержанием IgG (выше нормального диапазона IgG). Разведите такой образец в 2 раза нормальной сывороткой человека (однако разведение может привести к снижению чувствительности).

8.4. Интерпретация результатов

Образец является ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ:

- если все линии отрицательны.

- если интенсивность окрашивания одной антигенной линии $\pm$, остальные отрицательные.

Образец является **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ**:

- если интенсивность окрашивания двух или более антигенных линий $\pm$ или больше.

Образец считается **НЕОПРЕДЕЛЕННЫМ**:

- если интенсивность окрашивания одной антигенной линии 1+ или больше.

<i>Интенсивность окрашивания антигенных линий при считывании результата</i>		
Нет полосы	Одна полоса	Две или более полосы
Одна полоса = 0.5	Интенсивность окрашивания ≥ 1	Интенсивность окрашивания $\geq 0,5$
Отрицательный	Неопределенный	Положительный

ПРИМЕЧАНИЕ:

- если получен неопределенный результат, анализ необходимо повторить.

При получении аналогичного результата повторное исследование провести через 2 недели;

- если образец реагирует с контрольной стрептавидиновой линией более чем на $\pm$, другая линия также может быть положительной из-за неспецифической реакции, поскольку она тоже содержит стрептавидин. В этом случае результат считается **НЕИНТЕРПРЕТИРУЕМЫМ**. Рекомендуется протестировать другой образец сыворотки или плазмы крови от того же пациента.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Для достижения оптимального качества проводимого анализа необходимо четко следовать инструкции.
- Отрицательный результат не исключает, тем не менее, возможность инфицированности пациента *T. pallidum*.
- Использование разбавленных образцов может давать ложные результаты.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Условия хранения

Хранение наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °C в течение срока годности.

10.2. Условия транспортировки

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °C. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °C в течение трех дней.

10.3. Срок годности

Срок годности набора – 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Фирма-изготовитель.

«ИННОДЖЕНЕТИКС Н.В.», Технолоджипарк 6, В-9052, Гент, Бельгия.

(«INNOGENETICS N.V.», Technologiepark 6, В-9052, Gent, Belgium).