

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«30» ноября 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к

Treponema pallidum в реакции пассивной гемагглютинации

«РПГА-БЕСТ антипаллидум»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для выявления антител к *Treponema pallidum* в реакции пассивной гемагглютинации «РПГА-БЕСТ антипаллидум» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного определения специфических антител к *Treponema pallidum* в сыворотке крови и ликворе человека с возможностью полуколичественной оценки содержания антител (определение титра антител).

Набор может быть использован для скрининга и для диагностики сифилиса как составная часть комплекса серологических реакций.

1.2. Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

- основной набор – объем реагентов рассчитан на 100 качественных определений, включая контроли;
- комплект дополнительных компонентов для проведения 80 полуколичественных тестов (применяется только с основным набором).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода заключается во взаимодействии специфических антител, присутствующих в исследуемых образцах, с антигенами *Treponema pallidum* штамма Nichols, фиксированными на поверхности эритроцитов, с последующей характерной агглютинацией последних.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым, нач. отделения ИФА сифилиса Т.Г. Вяткиной и старшим биотехнологом отделения ИФА сифилиса М.А. Андреевой.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) Описание	Количество	
	Основной набор	Комплект дополнительных компонентов
Положительный контрольный образец (K⁺) Содержит антитела к <i>Treponema pallidum</i> . Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 0,5 мл	—
Отрицательный контрольный образец (K⁻) Не содержит антитела к <i>Treponema pallidum</i> . Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 0,5 мл	—
Тест-эритроциты (ТЭр) Суспензия куриных эритроцитов, сенсibilизированных антигенами <i>Treponema pallidum</i> . Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 8,5 мл	6 фл. по 8,5 мл
Контрольные эритроциты (КЭр) Суспензия куриных эритроцитов. Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 8,5 мл	—
Разводящий раствор (РР) Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 21,0 мл	2 фл. по 21,0 мл
Планшет с U-образными лунками	2 шт.	—

Объём реагентов основного набора позволяет провести не более 14 полуколичественных определений антител.

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая чувствительность оценивалась при клинических исследованиях:

- 276 серопозитивных образцов сыворотки крови и составила 100% (интервал 99%-100% с доверительной вероятностью 90%);
- 31 серопозитивного образца ликвора и составила 100% (интервал 91%-100% с доверительной вероятностью 90%);

Диагностическая специфичность оценивалась при клинических исследованиях:

- 276 серонегативных образцов сыворотки крови составила 100% (интервал 99%-100% с доверительной вероятностью 90%);
- 37 серонегативных образцов ликвора и составила 100% (интервал 92%-100% с доверительной вероятностью 90%);

3.2. Аналитическая специфичность оценивалась при клинических исследованиях:

- 276 образцов сыворотки крови беременных женщин, пациентов с патологическими концентрациями ревматоидного фактора, HBsAg, антителами к клещевым боррелиозам, ВИЧ-1,2, вирусу гепатита С, ВПГ-1,2, *Helicobacter pylori*, *Trichomonas vaginalis*, вирусу клещевого энцефалита (вак-

цинированные), *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, ЦМВ, показали отсутствие ложнопозитивных результатов, что говорит об отсутствии кросс-реактивности и высокой специфичности.

3.3. Потенциально интерферирующие вещества – триглицериды в концентрации до 40 мг/мл; билирубин в концентрации до 0,33 мг/мл, гемоглобин в концентрации до 10 мг/мл, общий белок в концентрации до 130 мг/мл – не оказывают влияния на получение правильных результатов выявления антител к *Treponema pallidum* в испытываемых наборах реагентов.

3.4. Воспроизводимость: при определении титра антител в трех образцах, заранее определенных как положительные, в 5 повторах в одной постановке и в 5 постановках в разные дни по одному определению значения титров антител во всех случаях совпадали (были равны).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Некоторые компоненты содержат натрия азид в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные и многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 200 мкл;
- микропробирки типа *Eppendorf* или полистироловые 96-луночные планшеты для предварительного разведения исследуемых образцов;
- полистироловые 96-луночные планшеты с U-образными лунками;
- крышки для планшетов иммунологических;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови и ликвора человека.

6.3. Образцы сыворотки крови, ликвора хранить при температуре (2–8) °С не более 5 суток или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы необходимо тщательно перемешать.

6.4. Инактивированные при 56 °С образцы сыворотки крови также могут быть использованы для анализа.

6.5. Образцы, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18-26) °С в течение 15-20 минут.

– Перед постановкой реакции флаконы с контрольными эритроцитами (КЭр) и тест-эритроцитами (ТЭр) встряхнуть до получения гомогенной взвеси.

Примечание: При хранении набора недопустимо подсыхание эритроцитов на стенках и крышках флаконов, затрудняющее получение гомогенной взвеси. Набор с конгломератами эритроцитов в работе не использовать, ввиду возможного получения ложных результатов.

- Перед использованием все реагенты перемешать.
- При дробном использовании набора после проведения анализа и учета результатов плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при температуре (2-8) °С, использовать в течение всего срока годности набора.
- Запрещается повторное использование планшетов.
- Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.
- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, не использовать дезинфицирующие средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), третичных аминов.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать 70 % раствором этилового спирта.

7.2. Подготовка контрольных и исследуемых образцов

7.2.1. Исследуемые и контрольные образцы сывороток необходимо предварительно развести 1:20. Для этого к 190 мкл разводящего раствора (РР) добавить 10 мкл образца, тщательно перемешать пипетированием.

7.2.2. Исследуемые образцы ликвора необходимо предварительно развести в 2 раза. Для этого к 50 мкл разводящего раствора (РР) добавить 50 мкл образца, тщательно перемешать пипетированием.

Для разведения образцов рекомендуем использовать 96-луночные планшеты или микропробирки типа «Eppendorf», или их аналоги.

Хранение: контрольные и исследуемые образцы в предварительном разведении – при температуре (18-26) °С не более 1 часа.

8. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

8.1. Качественный тест.

Для каждого исследуемого и контрольного образца использовать 2 лунки планшета (в одной лунке проводится реакция с тест-эритроцитами, во второй – с контрольными эритроцитами).

8.1.1. В две лунки горизонтального ряда (например, А1, А2) планшета с U-образными лунками внести по 25 мкл K^+ , предварительно разведённого 1:20 (п. 7.2), в две другие лунки (например, В1, В2) – по 25 мкл K^- , подготовленного аналогично. Каждый из исследуемых образцов, предварительно разведенных в соответствии с п. 7.2., также внести по 25 мкл в две лунки (С1 и С2, D1 и D2, и т.д.)

8.1.2. Флаконы с тест-эритроцитами (ТЭр) и контрольными эритроцитами (КЭр) встряхнуть до получения гомогенной взвеси.

8.1.3. Во все лунки первого вертикального ряда с образцами добавить по 75 мкл ТЭр, а во все лунки второго вертикального ряда с теми же образцами – по 75 мкл КЭр.

Примечание: конечное разведение после добавления эритроцитов составляет:

1:80 – для образцов сывороток;

1:8 – для образцов ликвора.

8.1.4. После внесения реагентов в лунки содержимое тщательно перемешать круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 15-20 сек.

8.1.5. Планшет закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-26) °С 45-60 мин, исключая любое постороннее воздействие на планшет.

8.2. Учёт результатов

Результаты оценивать визуально и интерпретировать согласно таблице 1 и рис. 1 и/или с использованием аппаратно-программных комплексов (например: аппаратно-программный комплекс «Эксперт-Лаб») в соответствии с инструкциями по их эксплуатации. Учёт результатов для исследуемых образцов проводится только в том случае, если для контрольных образцов получены адекватные результаты:

– для К⁺ – положительный;

– для К⁻ – отрицательный.

Таблица 1

Результат	Тест-эритроциты	Контрольные эритроциты
Положительный (4+, 3+)	Агглютинированные эритроциты в виде плёнки покрывают всё дно лунки или более 1/3 её поверхности с образованием краевого кольца (рис. 1).	Компактный осадок эритроцитов в центре лунки
Слабоположительный (2+)	Эритроциты образуют на дне лунки компактное кольцо с просветом менее 1/3 диаметра лунки и периферийной рыхлой агглютинацией (рис. 1).	
Сомнительный (1+/-)	Картина, не позволяющая однозначно отнести результат к слабоположительному или отрицательному (рис. 1).	
Отрицательный (-)	Эритроциты собираются в компактную пуговку на дне лунки. Возможно наличие едва различимого открытого центра (рис. 1).	
Неопределенный	Наличие агглютинации разной степени выраженности	Наличие агглютинации

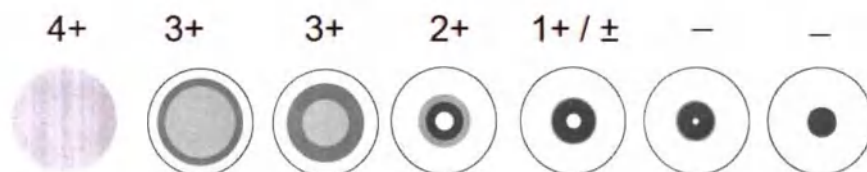


Рис. 1

Агглютинация эритроцитов в лунке с тест-эритроцитами при отсутствии агглютинации в лунке с контрольными эритроцитами свидетельствует о наличии в исследуемом образце антител к *Treponema pallidum*. Диаметр зоны агглютинации коррелирует со степенью позитивности образца.

Примечание: возможно образование агглютината с неровными краями, что свидетельствует об избытке антител в исследуемом образце.

Отсутствие агглютинации в обеих лунках свидетельствует об отсутствии специфических антител.

Агглютинация эритроцитов и в лунке с тест-эритроцитами, и в лунке с контрольными эритроцитами свидетельствует о неспецифической реакции. В этом случае необходимо повторить исследование, предварительно проведя абсорбцию данного образца сыворотки.

8.3. Абсорбция образцов, давших неспецифическую реакцию.

8.3.1. В микропробирку внести 190 мкл суспензии контрольных эритроцитов (КЭр), добавить 10 мкл образца, перемешать и выдержать при температуре (18-26) °С в течение 30 минут. Затем смесь отцентрифугировать при 2000 об/мин в течение 3 минут.

8.3.2. Повторить тест (п.п. 8.1.1.-8.1.5.) с полученным супернатантом (образец уже разведён 1:20).

Образец, давший положительный результат в качественном тесте, может быть раститрован с целью получения полуколичественной оценки концентрации специфических антител. Для этого проводят полуколичественный тест.

8.4. Полуколичественный тест.

8.4.1. Определение титра антител в ранее выявленных положительных образцах.

Для каждого исследуемого образца использовать вертикальный ряд (8 лунок планшета).

Внимание! В каждой постановке теста необходимо определять титр K^+ из основного набора.

Для анализа использовать образцы, предварительно разведенные в соответствии с п. 7.2.

8.4.2. Во все лунки каждого вертикального ряда (количество рядов соответствует количеству исследуемых образцов, включая K^+), кроме верхней, внести по 25 мкл разводящего раствора (РР).

8.4.3. В верхнюю (пустую) лунку соответствующего ряда внести 25 мкл подготовленного образца, затем ещё 25 мкл подготовленного образца внести во вторую лунку того же ряда, после чего раствор во второй лунке тщательно перемешать пипетированием, отобрать 25 мкл и перенести их в

третью лунку. Раствор в третьей лунке также перемешать пипетированием, отобрать 25 мкл, которые перенести в четвёртую лунку и т.д. до восьмой лунки. Из восьмой лунки после перемешивания удалить 25 мкл раствора в ёмкость с дезинфицирующим раствором.

Проделать аналогичную процедуру с каждым образцом в соответствующем ряду лунок.

8.4.4. Во все используемые лунки планшета внести по 75 мкл тест-эритроцитов (ТЭр), предварительно перемешав их встряхиванием флакона до получения гомогенной взвеси.

Примечание: после добавления тест-эритроцитов получается ряд 2-кратных разведений:

для каждого образца сыворотки – от 1:80 (в 1-ой лунке) до 1:10240 (в 8-ой лунке);

для каждого образца ликвора – от 1:8 (в 1-ой лунке) до 1:1024 (в 8-ой лунке).

Содержимое лунок тщательно перемешать круговыми движениями планшета по поверхности стола.

8.4.5. Планшет закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-26) °С 45-60 мин, исключая любое постороннее воздействие на планшет.

8.4.6. Учет результатов.

8.4.6.1. Результаты полуколичественного теста учитываются в том случае, если титр, определенный для положительного контрольного образца (K^+), отличается от указанного в паспорте значения не более чем на одно разведение.

За титр антител принимают максимальное разведение образца, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует в вертикальном положении транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться в вертикальном положении при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Перед постановкой на хранение интенсивно встряхнуть набор, не открывая его.

10.3. Срок годности набора реагентов – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РПГА-БЕСТ антипаллидум» обращаться:
в АО «Вектор-Бест» по адресу: 630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел. (383) 252-51-62, 227-60-30.
тел./факс (383), 252-51-81, 252-51-77.
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-74.

Старший биотехнолог
отделения ИФА сифилиса
АО «Вектор-Бест»

М.А. Андреева

Нач. отделения ИФА сифилиса
АО «Вектор-Бест»

Т.Г. Вяткина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
М.П.



Т.И. Поспелова



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.

"30" ноября 2021 г.



[Handwritten signature]