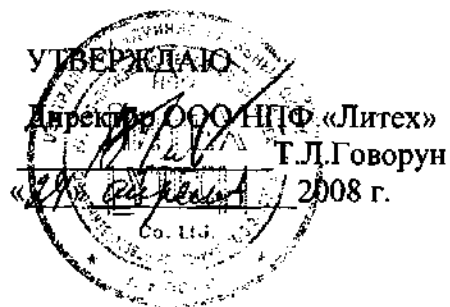




УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
От _____ 200 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

набора реагентов для выявления суммарных антител
к *Treponema pallidum* в сыворотке (плазме) крови человека
методом иммуноферментного анализа

«ИФА-Анти-Lues-рек»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «ИФА-Анти-Lues-рек» предназначен для выявления суммарных антител к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum* в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение анализа 96 исследуемых образцов, включая контроли. Возможно дробное использование набора (по одному стрипу).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на связывании антител, присутствующих в тестируемом образце, с комплексом рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*, сорбированных на поверхности лунок планшета. С образовавшимся иммунным комплексом связывается конъюгат (комплекс рекомбинантных белков *Treponema pallidum*, конъюгированных с ферментом –пероксидазой хрена). Далее, после добавления субстрата и хромогена (ТМБ), в ходе ферментативной реакции происходит конверсия окраски ТМБ – раствор приобретает синий цвет, а после остановки реакции стоп-реагентом – желтый. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию в образце антител к *Treponema pallidum*.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты:

- Иммуносорбент, планшет 96-луночный полистироловый, разборный, с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок комплексом рекомбинантных антигенов

Treponema pallidum - 1 шт.;

- контрольный положительный образец (K+) - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела к *Treponema pallidum*; прозрачная опалесцирующая светло-красного цвета жидкость, (0,7 мл) - 1 пробирка;
- контрольный отрицательный образец (K-) - сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая антитела к *Treponema pallidum*; прозрачная опалесцирующая светло-синего цвета жидкость, (1,4 мл) - 1 пробирка;
- раствор для разведения образцов (фосфатно-солевой буфер со стабилизаторами); прозрачная опалесцирующая светло-синего цвета жидкость, (8 мл) - 1 флакон;
- конъюгат (концентрат х 11) - комплекс рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*, конъюгированных с пероксидазой хрена; прозрачная опалесцирующая розового цвета жидкость, (1,5 мл) - 1 флакон;
- раствор для разведения конъюгата (фосфатно-солевой буфер со стабилизаторами); прозрачная опалесцирующая зеленого цвета жидкость, (15 мл) - 1 флакон;
- отмывочный буферный раствор (концентрат х 20); прозрачная бесцветная жидкость, (50 мл) - 1 флакон;
- субстратный буфер с перекисью водорода; прозрачная бесцветная жидкость, (15 мл) - 1 флакон;
- ТМБ-хромоген (концентрат х11); прозрачная бесцветная жидкость, (1,5 мл) - 1 пробирка;
- стоп-реагент (кислота серная, 0,5М); прозрачная бесцветная жидкость, (15 мл) - 1 флакон;
- пленка для заклеивания планшета. - 2 шт.

Примечание. Контрольные образцы (K+ и K-) отконтролированы на отсутствие маркеров ВИЧ (антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1); гепатита В (HBsAg); гепатита С (антитела) методом ИФА в тест-системах, зарегистрированных в РФ.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, в состав которого входит серная кислота, в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Стоп-реагент, содержащий серную кислоту действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы ее следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

При работе с набором следует соблюдать «Правила 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.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать возбудителей гемотрансмиссивных инфекций.

При утилизации тестируемых образцов необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- автоматический промыватель планшетов;
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру +37 °С, или планшетный шейкер-термостат на температуру +37 °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-300 мкл;
- ванночки для реагентов;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека, подготовленные стандартным образом. Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо сохранять в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Отобранные образцы сывороток хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 72 ч, для более длительного хранения их замораживают и хранят при минус 18 °С и ниже, избегая многократного замораживания-оттаивания. Пробы, содержащие агрегаты или осадок, осветляют центрифугированием. Каждый образец отбирается индивидуальным наконечником. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Приготовление рабочего отмывочного раствора. Концентрат отмывочного раствора

развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего раствора – 1 месяц при температуре от 2 до 8 °С.

Для анализа одного стрипа: 4 мл концентрата довести до 80 мл дистиллированной водой.

Приготовление рабочего раствора конъюгата. Концентрат конъюгата развести раствором для разведения конъюгата в 11 раз. Готовится непосредственно перед использованием.

Для анализа одного стрипа: 1,0 мл раствора для разведения конъюгата смешать с 100 мкл концентрата конъюгата.

Приготовление рабочего раствора ТМБ. Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Для анализа одного стрипа: 0,1 мл концентрата ТМБ влить в 1 мл субстратного буфера. Хорошо перемешать.

В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытый планшет следует хранить в плотно закрытом пакете с осушителем при температуре от 2 до 8 °С не более 3 мес;
- контрольные образцы, раствор для разведения исследуемых образцов, концентрат конъюгата, концентрат ТМБ и субстратный буфер после вскрытия флаконов следует хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 мес;
- рабочий отмывочный раствор следует хранить в закрытой емкости при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес;
- рабочий раствор ТМБ хранению не подлежит;
- рабочий раствор конъюгата хранению не подлежит;
- стоп-реагент следует хранить в закрытой емкости при комнатной температуре в течение всего срока годности.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Потенциальный риск применения набора – класс 2 б.

Выдержать компоненты набора и анализируемые образцы крови при комнатной температуре (18 - 25 °С) не менее 30 мин. Пакет с планшетом не открывать! Встряхнуть все компоненты набора.

Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество образцов + 3 лунки для К- + 2 лунки для К+; при использовании одного стрипа – 1 лунка для

К+ и 2 лунки для К-). Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с осушителем должен оставаться внутри).

Внести во все лунки по 50 мкл раствора для разведения образцов. В две лунки внести по 50 мкл К+, в три лунки по 50 мкл К-, в остальные лунки внести по 50 мкл тестируемых образцов. Общее время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

Заклеить планшет липкой лентой, осторожно перемешать содержимое лунок, слегка встряхивая планшет, в течение 30 с и инкубировать 1 ч при 37 °С.

Удалить жидкость из лунок и промыть лунки планшета 5 раз рабочим отмывочным раствором (см. п. 7.1); внося в каждую лунку планшета по 250 мкл отмывочного раствора. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Заклеить планшет липкой лентой и инкубировать 30 мин при 37 °С.

Содержимое лунок удалить и промыть лунки планшета 5 раз рабочим отмывочным раствором (см. п. 8.5).

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ.

Инкубировать планшет в защищенном от света месте при комнатной температуре в течение 30 мин.

Внести по 100 мкл стоп-реагента во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ. Перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 с.

Не позднее чем через 10 мин провести измерение величины оптической плотности в лунках планшета на фотометре при длине волны 450 нм с настройкой бланка по воздуху (до измерения хранить планшет в защищенном от света месте).

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитать среднее арифметическое значение показателей оптической плотности в лунках с К- (контрольным отрицательным образцом).

Рассчитать среднее арифметическое значение показателей оптической плотности в лунках с К+ (контрольным положительным образцом).

Результаты исследования оценивают только в том случае, если ОП(К)^{ср} не более 0,2 единиц оптической плотности, а ОП(К⁺)^{ср} - не менее 1,0 единицы оптической плотности.

Рассчитать ОП_{крит} по формуле:

ОП_{крит} = ОП(К)^{ср} + К* (конкретное значение указано в паспорте к серии наборов)

Определить индекс антител по формуле:

$$\text{Индекс антител} = \text{ОП образца} : \text{ОП крит}$$

<i>Индекс антител</i>	<i>Результат</i>
< 0,9	Отрицательный
0,9 – 1,1	Серая зона
> 1,1	Положительный

Образцы с индексом антител ниже 0,9 оцениваются как не содержащие антител к возбудителю сифилиса.

Образцы с индексом антител более 1,1 оцениваются как содержащие антитела к возбудителю сифилиса.

При попадании величины ОП образца в “серую зону” ($0,9 \text{ ОПкрит} < \text{ОПобр} < 1,1 \text{ ОПкрит}$) результат считается неопределенным. В этом случае необходимо повторить исследование сыворотки пациента на антитела к *Treponema pallidum* в динамике через 1-2 недели после первого забора крови. Для большей достоверности оценки динамики специфических антител рекомендуется повторно взятый образец сыворотки/плазмы крови анализировать одновременно с предыдущим.

Внимание: Полученные результаты не могут служить основанием для постановки диагноза и должны интерпретироваться только в комплексе с анамнезом, данными клинического наблюдения и результатами других диагностических процедур.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор реагентов «ИФА-Анти-Lues-рек» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре от 9 до 25 °С не более 3 сут. Замораживание не допускается.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год.

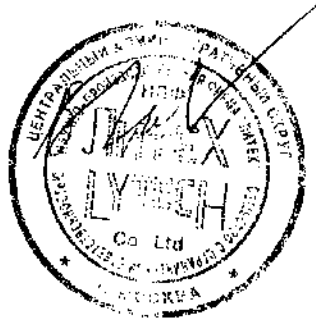
Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

По вопросам, касающимся качества набора «ИФА-Анти-Lues-рек», следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская д.1 стр.3,

телефон/факс: (495)246-45-01, или (e.mail) info@lytech.ru

и в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д 41, тел. (495) 241-39-22.

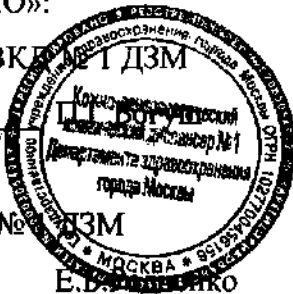
Директор ООО НПФ «Литех»



В.М.Говорун

«СОГЛАСОВАНО»:

Главный врач КВКБ №1 ДЗМ



Зав. КДЛ КВКД № 13М

~~SECRET~~
E.D. 100-110000-110000