«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к *Treponema pallidum* в реакции гемагглютинации

РПГА-БЕСТ антипаллидум

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов РПГА-БЕСТ антипаллидум (далее по тексту - набор) предназначен для выявления специфических антител к *Treponema pallidum* в сыворотке крови человека и рекомендуется для диагностики сифилиса как составная часть комплекса серологических реакций.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 100 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода заключается во взаимодействии специфических антител, присутствующих в исследуемых образцах, с антигеном *Treponema pallidum,* фиксированным на поверхности эритроцитов, с их последующей характерной агглютинацией.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– положительный контрольный образец ($К^+$), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;

– отрицательный контрольный образец ($К^-$), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;

– тест-эритроциты (ТЭр) – 1 фл., 8,5 мл;

– контрольные эритроциты (КЭр) – 1 фл., 8,5 мл;

– разводящий раствор (РР) – 1 фл., 21 мл;

– планшет с U-образными лунками – 2 шт.;

– инструкция по применению.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления антител к *Treponema pallidum* – 100 % при анализе сывороток, содержащих антитела к *Treponema pallidum*, стандартной панели предприятия (СПП$^{+}$, рег. № СОП-05-6).

3.2. Специфичность выявления антител к *Treponema pallidum* – 100% при анализе сывороток, не содержащих антитела *Treponema pallidum*, стандартной панели предприятия (СПП$^{-}$, рег. № СОП-04-42).

3.3. Результат количественного определения набором антител к *Treponema pallidum* в положительном контрольном образце должен соответствовать титру 1:320 – 1:1280.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующим средством, разрешенным к применению в лабораториях (например, 6% раствором перекиси водорода в течение 1 часа).

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

– Холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные и многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 4 до 200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

– микропробирки типа *Eppendorf* или полистироловые 96-луночные планшеты для предварительного разведения образцов;

– перчатки резиновые хирургические;

– разрешенные к применению дезинфицирующие средства (например, 6% раствор перекиси водорода).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа желательно использовать свежеотобранные образцы сыворотки крови. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2-8°С не более 5 суток, либо при температуре минус 20±3 °С не более 1 месяца.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифуговать 10-15 минут при 3000 об/мин.

Нельзя использовать сыворотки гемолизированные, гиперлипидные, с признаками бактериального прироста, подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать 20-30 минут при температуре 18-25 °С.

Сразу после постановки реакции плотно закрытые флаконы с компонентами необходимо поместить в холодильник (температура хранения 2-8 °С).

Запрещается повторное использование планшетов для проведения реакции.

7.1. Подготовка контрольных и исследуемых образцов

Приготовить предварительное разведение 1:20 контрольных и исследуемых образцов. Для этого внести во вспомогательный ряд пробирок или в лунки вспомогательного планшета по 190 мкл разводящего раствора и добавить по 10 мкл образца, тщательно перемешать пипетированием.

Предварительно разведенные образцы хранению не подлежат.

7.2. Проведение качественного теста

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

7.2.1. В две лунки (А1, А2) горизонтального ряда планшета с U-образными лунками внести по 25 мкл положительного контрольного образца, предварительно разведённого 1:20 (п. 7.1), в две другие лунки (В1, В2) – по 25 мкл отрицательного контрольного образца, подготовленного аналогично. Каждый из исследуемых образцов, предварительно разведенных 1:20, также внести по 25 мкл в две лунки (С1 и С2, D1 и D2 и т.д.)

7.2.2. Во все лунки первого вертикального ряда с образцами добавить по 75 мкл тест-эритроцитов, предварительно перемешав их осторожным встряхиванием до получения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гомогенной суспензии, а во все лунки второго вертикального ряда с теми же образцами – по 75 мкл контрольных эритроцитов, также предварительно перемешав их.

Примечание! Конечное разведение образцов после добавления эритроцитов составляет 1:80.

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

7.2.4. Планшет закрыть крышкой и оставить на 45-60 мин при температуре 18-25 °С, исключая любое постороннее воздействие на планшет.

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

7.3. Абсорбция испытуемых сывороток (для сывороток, давших неспецифическую реакцию).

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

7.3.2. Повторить тест (п.п. 7.2 и 9.1) с полученным супернатантом (образец уже разведён 1:20).

7.4. Проведение количественного теста

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

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

В каждой постановке теста необходимо проводить титрование положительного контрольного образца ($К^+$).

7.4.1. Для анализа использовать образцы, предварительно разведённые 1:20 (см. п. 7.1).

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

7.4.3. 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,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

7.4.4. Во все используемые лунки планшета внести по 75 мкл тест-эритроцитов (ТЭр).

Примечание: после добавления тест-эритроцитов для каждого образца получается ряд 2-кратных разведений от 1:80 (в первой лунке) до 1:10 240 (в восьмой лунке).

7.4.5. Содержимое лунок тщательно перемешать круговыми движениями планшета по поверхности стола.

7.4.6. Планшет закрыть крышкой и оставить при комнатной температуре на 45-60 минут.

7.4.7. Определить титр антител в сыворотках в соответствии с п. 9.2.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты оцениваются визуально.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учёт результатов качественного теста

Результаты интерпретируются согласно таблице 1 и рис.1.

Таблица 1

Учёт результатов реакции

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

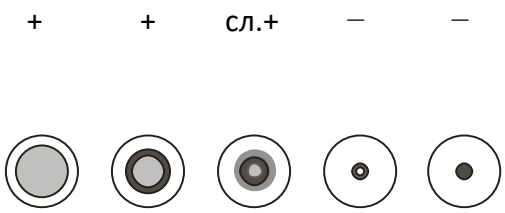


Рис. 1 Учёт результатов реакции

Учёт результатов для исследуемых образцов проводится только в том случае, если для контрольных образцов получены адекватные результаты: для $К^+$ - положительный, для $К^-$ - отрицательный.

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

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 (см. п. 7.3).

9.2. Учёт результатов количественного теста

За титр антител в сыворотке принимают её максимальное разведение, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов.

Результаты количественного теста учитываются в том случае, если титр, определённый для положительного контрольного образца ($К^+$), находится в интервале 1:320 – 1:1280.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

Транспортирование наборов должно проводиться при температуре 2-8 °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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам, касающимся качества набора обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru