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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ассоциированных с сифилисом антител к кардиолипину в реакции преципитации

Антикардиолипин-РПР-БЕСТ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Антикардиолипин-РПР-БЕСТ (далее по тексту - набор) предназначен для определения ассоциированных с сифилисом реагиновых антител класса IgG и IgM к липидам клеточной оболочки трепонем в сыворотке (плазме) крови или спинномозговой жидкости (ликворе) человека.

Набор реагентов может быть использован для первичного скрининга и наблюдения за эффективностью лечения больных сифилитической инфекцией.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 400 исследований, включая контрольные (с К+ и К- в каждой постановке).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на реакции преципитации (флоккуляции). При добавлении к сыворотке (плазме) крови больного сифилисом или к спинномозговой жидкости больного нейросифилисом суспензии стабилизированного кардиолипинового антигена (АГк) образуется преципитат (комплексы антиген-антитело), выпадающий в виде хлопьев; результат исследования оценивают визуально.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– антиген кардиолипиновый (АГк), готовый для использования – 2 фл. по 4,0 мл;

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

– положительный контрольный образец, инактивированный ($К^+$), готовый для использования – 2 фл. по 1,0 мл;

– отрицательный контрольный образец, инактивированный ($К^–$), готовый для использования – 2 фл. по 2,0 мл;

– тест-карточки для проведения исследования, готовые для использования – 50 шт. (на 8 проб каждая);

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат выявления антител к кардиолипину в $К^+$ должен быть не менее 3+ (агрегаты частиц синего цвета средней величины).

3.2. Чувствительность на разных стадиях заболевания.

Антифосфолипидные антитела, выявляемые этим тестом, находят у 80-85% пациентов с первичным сифилисом, у 98-100% пациентов с вторичным и ранним латентным (скрытым) сифилисом и у 60-70% пациентов с поздним сифилисом.

3.3. Специфичность.

Специфичность определения «сифилитических реагинов» с помощью кардиолипинового антигена составляет 96%.

3.4. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результатов данного теста составляет 100%.

3.5. Ложные реакции.

Ложноотрицательные результаты могут наблюдаться у пациентов с ранним первичным и поздним латентным сифилисом. У пациентов с вторичным сифилисом встречаются редко (в 1-2% случаев) и могут быть связаны с эффектом «прозоны»: очень высокие титры реагиновых АТ в сыворотке крови ингибируют преципитацию комплексов АГ-АТ, поэтому при проверке неразведённой сыворотки иногда получается отрицательный или очень слабый результат; при разведении сыворотки реактивность возрастает.

Ложноположительные результаты.

Антилипоидные антитела могут появляться не только вследствие сифилиса или других трепонемных инфекций, но и в ответ на развитие нетрепонемных заболеваний острой или хронической формы, при которых наблюдается повреждение тканей (особенно часто при аутоиммунных заболеваниях). Беременность и наркомания тоже могут дать ложноположительный результат.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом (ГОСТ Р 52905-2007. Требования безопасности для медицинских лабораторий):

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

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

– Холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 15 до 500 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

– шейкер орбитального типа, позволяющий производить перемешивание в горизонтальной плоскости с частотой 100 об/мин и амплитудой не менее 20 мм;

– таймер;

– перчатки резиновые хирургические;

– натрий хлористый;

– дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать свежеотобранные образцы сыворотки (плазмы) крови или спинномозговой жидкости (ликвор). Допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток, либо при температуре минус 20±3 °С не более 1 месяца.

Образцы сыворотки (плазмы) крови или ликвора, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифуговать 10-15 минут при 1000-2000 об/мин.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать в течение 30 минут при температуре от 18 до 25 °С.

Сразу после постановки реакции плотно закрытые флаконы с компонентами необходимо поместить в холодильник.

Запрещается повторное использование тест-карточек для проведения исследования.

7.1. Подготовка контрольных образцов

Контрольные образцы (К+ и К–) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.2. Подготовка кардиолипинового антигена

Кардиолипиновый антиген готов к использованию. Перед применением осторожно, но тщательно перемешать до образования гомогенной суспензии.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора во флаконе из темного стекла.

7.3. Подготовка тест-карточек

Готовы к использованию.

Хранение: при температуре от 18 до 25 °С в течение всего срока годности набора.

7.4. Проведение качественного теста

Для каждого исследуемого и контрольного образца использовать по одной лунке тест-карточки.

7.4.1. На поверхность одной из лунок тест-карточки автоматической пипеткой нанести 40 мкл положительного контрольного образца и равномерно распределить объём по всей поверхности лунки наконечником пипетки.

На поверхность другой лунки точно так же нанести 40 мкл отрицательного контрольного образца.

На поверхность остальных лунок - по 40 мкл исследуемых образцов.

Внимание! Для каждого образца использовать отдельный наконечник для пипетки.

7.4.2. В каждую лунку с контрольными или исследуемыми образцами добавить пипеткой по 15 мкл гомогенной суспензии кардиолипинового антигена (АГк). Вносить АГк осторожно (каплей), не касаясь наконечником пипетки поверхностей лунок с образцами.

7.4.3. После внесения реагентов инкубировать содержимое лунок в течение 8 мин при температуре от 18 до 25 °С, поместив карточки на горизонтальную поверхность шейкера при скорости вращения ротора 100 об/мин.

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

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

7.5. Проведение полуколичественного теста (определение титра реагиновых антител).

7.5.1. В лунки № 1-4 тест-карточки автоматической пипеткой нанести по 40 мкл 0,9% раствора NaCl для одного исследуемого образца.

7.5.2. В лунки № 1 добавить 40 мкл исследуемого образца и, используя тот же наконечник, перемешать при помощи осторожного пипетирования. Затем перенести 40 мкл смеси из лунки № 1 в лунку № 2, а оставшуюся в лунке № 1 смесь равномерно распределить наконечником пипетки по всей поверхности.

7.5.3. Перемешать разведение исследуемого образца в лунке № 2 пипетированием и перенести 40 мкл смеси в лунку № 3, а оставшуюся в лунке № 2 разведение равномерно распределить наконечником пипетки по всей поверхности лунки.

7.5.4. Повторить процедуру, описанную в п. 7.5.3, до лунки № 4, из которой удалить 40 мкл смеси. Оставшуюся смесь равномерно распределить наконечником пипетки по поверхности лунки. Полученные разведения исследуемого образца будут соответствовать:

— в лунке № 1 — 1:2;

— в лунке № 2 — 1:4;

— в лунке № 3 — 1:8;

— в лунке № 4 — 1:16.

7.5.5. В каждую лунку добавить пипеткой по 15 мкл гомогенной суспензии АГк, как описано в п. 7.4.2.

7.5.6. Содержимое кругов инкубировать, как описано в п. 7.4.3.

7.5.7. Сразу же по окончании срока инкубации провести учёт результатов (см. п. 7).

Внимание! Если в полуколичественном тесте при с разведением 1:16 исследуемого образца получен положительный результат исследования, то проводят дополнительное исследование его последующих 2-кратных разведений.

В качестве растворителя для приготовления последующих разведений исследуемого образца следует использовать отрицательный контрольный образец ($К^-$), разведённый в 50 раз в 0,9% растворе хлористого натрия (10 мкл $К^-$ + 490 мкл 0,9% раствора NaCl).

Исследуемый образец необходимо сначала развести данным раствором в 16 раз (10 мкл образца + 150 мкл раствора $К^-$). Затем выполнить процедуры, описанные в п. 7.5, используя вместо 0,9% раствора NaCl приготовленное разведение $К^-$.

Полученные разведения исследуемого образца будут соответствовать:

—в лунке № 1 — 1:32;

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

—в лунке № 2 — 1:64;

—в лунке № 3 — 1:128;

—в лунке № 4 — 1:256.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты оцениваются визуально.

9. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Учёт результатов качественного теста

Учёт результатов проводят визуально в условиях хорошей освещённости сразу же по окончании инкубации. При более позднем считывании возможна неспецифическая агглютинация. Результаты исследования должны учитываться в сравнении с тем, что наблюдается в лунках с $К^+$ и $К^–$:

• $К^–$ — гомогенная суспензия синего цвета, отсутствие видимой преципитации частиц;

• $К^+$ — отчётливые преципитаты частиц синего цвета (реакция не менее 3+).

Положительный результат исследования – в лунке присутствуют преципитаты частиц разной величины синего цвета, величина которых оценивается в условных единицах - «плюсах» (4+ – крупные, 3+ – средние, 2+ – мелкие); одновременно наблюдается просветление общего фона реакционной среды.

Отрицательный результат исследования – в лунке присутствует однородная суспензия частиц синего цвета; преципитация частиц отсутствует.

9.2. Учёт результатов полуколичественного теста

При полуколичественном исследовании титром антител к кардиолипиновому антигену считается наибольшее разведение исследуемого образца, при котором наблюдается положительный результат.

Положительный результат РПР-теста не является основанием для постановки диагноза сифилитической инфекции. Исследуемые образцы, дающие положительные результаты, подлежат дальнейшему исследованию в специфических трепонемных серологических реакциях на сифилис (ИФА, РПГА, РИФ, иммуноблоттинг и другие).

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 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.

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