"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор ЗАО "ЭКОлаб"

_____ В.Ю.Борисов

04.06.2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К TREPONEMA PALLIDUM В РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ
(Сифилис-РПГА-тест)

Регистрационное удостоверение № ФСР2010/08228 от 23.05.2018 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Для качественного и полуколичественного определения антител к Treponema pallidum в сыворотке (плазме) крови и спинно-мозговой жидкости (СМЖ) человека с помощью реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) при "ручной" постановке реакции и визуальном учете результатов и при использовании аппаратно-программных комплексов "Критерий-2", "Эксперт-Лаб", ридеров типа Anthos LP400, MRX, MR7000, Dynateh MRXII и автоматических анализаторов типа Olimpus PK 3000.

СОСТАВ НАБОРА

Тест-эритроциты (ТЭ) – 0,4% суспензия куриных эритроцитов, сенсибилизированных нативными антигенами Treponema pallidum, штамм Nichols"; суспензия красно-коричневого цвета.

Контрольные эритроциты (КЭ) – 0,4% суспензия куриных эритроцитов, не нагруженных антигенами; суспензия красно-коричневого цвета.

Буферный раствор (БР) – фосфатно-солевой буферный раствор для разведения образцов (сыворотки, плазмы крови, СМЖ), содержащий компоненты, предотвращающие неспецифическую агглютинацию; прозрачная жидкость желтого или желто-оранжевого цвета.

Контрольный положительный образец ($К^+$) – жидкая стандартная сыворотка крови человека (или кролика), содержащая антитела к Treponema pallidum в титре 1:2560, дающая отрицательную реакцию на HBsAg и не содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусу гепатита С, инактивированная, содержит консервант – азид натрия в конечной концентрации 0,095 %; прозрачная бесцветная или желтоватого цвета жидкость.

Примечание: $К^+$ стандартизован по содержанию антител с использованием международного стандарта ВОЗ (NIBSC, London, UK)

Контрольный отрицательный образец ($К^-$) - жидкая сыворотка крови человека (или кролика), не содержащая антитела к Treponema pallidum, дающая отрицательную реакцию на HBsAg и не содержащая антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусу гепатита С; инактивированная, содержит консервант – азид натрия в конечной концентрации 0,095 %; прозрачная бесцветная или желтоватого цвета жидкость.

Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

комплект № 1 – для качественного определения (выявление наличия антител);

комплект № 2 – для качественного и полуколичественного определения (определение титра антител).

Объемы реагентов в обоих комплектах рассчитаны на проведение 100 определений, включая контрольные.

КОПИЯ ВЕРНА

подпись _____

Борисов В.Ю.
Ген. директор ЗАО «ЭКОлаб»

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на реакции пассивной (непрямой) гемагглютинации. Антигенные компоненты Treponema pallidum сорбированы на поверхности формалинизированных куриных эритроцитов. При наличии в сыворотке (плазме) крови и спинно-мозговой жидкости (СМЖ) специфических антител к T. pallidum, эритроциты слипаются, что приводит к появлению характерной картины реакции в лунках планшета. Суспензия эритроцитов содержит специальные добавки, предотвращающие неспецифическую агглютинацию

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НАБОРА

Диагностическая чувствительность при исследовании клинических образцов, заведомо содержащих антитела к Treponema pallidum – 100 %.

Диагностическая специфичность при обследовании образцов крови доноров (не менее 5000 образцов) – 99,94 %.

Специфичность теста при обследовании потенциально перекрестно реактивных образцов сыворотки, полученных от пациентов с различными патологиями и измененным иммунным статусом, а также от пациентов с не связанными с сифилисом заболеваниями - 99,96%.

Минимальное содержание антител к Treponema pallidum, определяемое набором в международном стандарте NIBSC (London, UK) – 0,0025 МЕ/мл.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Реакцию проводят с сывороткой (плазмой) крови или СМЖ.

Нельзя использовать гемолизированные, хилезные или проросшие образцы.

При наличии включений исследуемые образцы центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. Пробы, предназначенные для исследования, могут храниться до 7 сут при температуре от 2 до 8°С или не более 3 мес при температуре минус 20°С.

Все образцы могут подвергаться замораживанию/оттаиванию только однократно. После размораживания образцы тщательно перемешать.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Меры предосторожности – 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.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для "ручной" постановки

- часы;
- пипетки полуавтоматические, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 100 мкл и от 200 до 1000 мкл;
- перчатки резиновые или пластиковые.

Для постановки с использованием средств автоматизации поставки и учета

- аппаратно-программный комплекс "Критерий-2" или "Эксперт-Лаб";
- или ридер типа или Anthos LP400, или MRX, или MR7000, или Dynateh MRXII;
- или автоматический анализатор типа Olimpus PK 3000

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Все реагенты до начала анализа выдержать 15-20 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Суспензии КЭ и ТЭ осторожно перемешать до однородного состояния.

КОПИЯ ВЕРНА
ПОДПИСЬ
Борисов В. Ю.
Ген. директор ЗАО «ЭКОлаб»
ЭКОлаб
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

$К^+$ и $К^-$ развести 1:20 в БР (10 мкл контрольного образца внести в 190 мкл БР). .

Исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови развести 1:20 в БР(10 мкл сыворотки (плазмы) крови внести в 190 мкл БР) .

Исследуемые образцы СМЖ развести 1:5 в БР(40 мкл СМЖ внести в 160 мкл БР). .

Разведения контрольных и исследуемых образцов могут быть приготовлены непосредственно в планшете или во вспомогательных пробирках (флаконах).

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Качественное определение

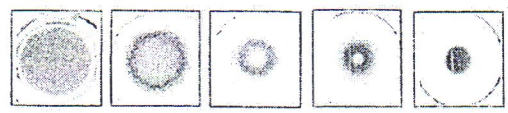
Для каждого исследуемого образца использовать по одной лунке в двух смежных рядах планшета. По две лунки оставить для $К^+$ и $К^-$.

Внести по 25 мкл каждого образца, разведенного 1:20 (образцы сывороток, включая $К^+$ и $К^-$) или 1:5 (СМЖ), в две смежные лунки. В одну из них внести по 75 мкл ТЭ, в другую – по 75 мкл КЭ (после добавления ТЭ и КЭ конечное разведение образцов сыворотки или плазмы крови – 1:80 и образцов СМЖ – 1:20).

Планшет осторожно покачать, чтобы перемешать содержимое лунок, и выдержать не менее 45 мин при температуре от 18 до 25 °С в условиях, исключающих вибрацию, после чего учесть результаты реакции. Допускается учитывать результаты реакции через 24 ч после постановки.

Визуальный учет результатов

Результаты РПГА оцениваются по внешнему виду осадка эритроцитов на дне лунки, как показано на рисунке.



Полученные результаты интерпретируются как:

- *Резко положительный* – ровный слой ("зонтик") агглютинированных эритроцитов, распределенных по дну лунки (4+)
- *Положительный* – эритроциты располагаются на большей части дна лунки, при этом по периферии осадка формируется заметное кольцо (3+).
- *Слабоположительый* – эритроциты располагаются на небольшой части дна лунки, в центральной части формируется плотное кольцо из осадка эритроцитов с заметным просветлением в центральной части (2+).
- *Неопределенный* – наличие небольшого рыхлого осадка эритроцитов с нечеткими краями в центральной части лунки с незначительным просветом в центре на свободном от эритроцитов окружающем фоне (1+ или ±)
- *Отрицательный* – компактный осадок ("пуговка") в центральной части дна лунки на чистом окружающем фоне (–).

Результаты реакции с исследуемыми образцами учитывают при условии положительного результата ТЭ с $К^+$, отрицательного результата ТЭ с $К^-$ и отрицательного результата КЭ с $К^+$ и $К^-$.

$К^+$, $К^-$должны быть обязательно протестированы при каждом новом исследовании.

При получении положительного результата с ТЭ и КЭ исследование образца необходимо повторить. Повторное получение аналогичного результата свидетельствует о наличии в образце антиэритроцитарных антител, которые необходимо предварительно абсорбировать. Для этого исходный образец необходимо развести суспензией КЭ в соотношении 1:20 и выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С, после чего центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, отобрать супернатант и исследовать его в РПГА, как описано выше.

Учет результатов при использовании аппаратно-программных комплексов (АПК)

КОПИЯ ВЕРНА
ПОДПИСЬ
Борисов В. Ю.
Ген. директор ЗАО «ЭКОлаб»
ЭКОлаб
ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО ЭЛЕКТРОПРОМ

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

Анализ с использованием аппаратно-программных комплексов проводить в соответствии с инструкциями по их эксплуатации (за консультациями и адаптационными листами можно обращаться в ЗАО "ЭКОлаб").

Определение титра антител

Проводить с образцами, давшими резко положительный, положительный или слабоположительный результат при качественном определении.

Проводить с обязательным параллельным титрованием $К^+$.

Для титрования использовать по 8 лунок в каждом ряду планшета (один ряд для каждого образца, включая $К^+$).

Исследование сыворотки (плазмы) крови

В первые лунки всех рядов внести по 25 мкл соответствующих образцов, разведенных 1:20, во все остальные - по 25 мкл БР.

Приготовить серийные двукратные разведения каждого образца, для чего в лунку 2 каждого ряда внести 25 мкл соответствующего образца, разведенного 1:20; перемешать и 25 мкл полученного разведения (1:40) внести в лунку 3; перемешать и перенести 25 мкл полученного разведения (1:80) в лунку 4 и так – до разведения 1:2560 в лунке 8, из которой после приготовления указанного разведения удалить 25 мкл.

Во все лунки каждого ряда внести по 75 мкл ТЭ.

Планшет осторожно покачать, чтобы перемешать содержимое лунок, и выдержать не менее 45 мин при температуре от 18 до 25 °С, после чего учесть результаты реакции.

Исследование СМЖ

В первые лунки рядов планшета внести по 25 мкл образцов СМЖ в разведении 1:5, во все последующие лунки этих рядов – по 25 мкл БР.

Приготовить серийные двукратные разведения каждого образца СМЖ, для чего в лунку 2 каждого ряда внести 25 мкл соответствующего образца, разведенного 1:5; перемешать и 25 мкл полученного разведения (1:10) внести в лунку 3; перемешать и перенести 25 мкл полученного разведения (1:20) в лунку 4 и так – до разведения 1:640 в лунке 8, из которой после приготовления указанного разведения удалить 25 мкл.

Во все лунки каждого ряда внести по 75 мкл ТЭ.

Планшет осторожно покачать, чтобы перемешать содержимое лунок, и выдержать не менее 45 мин при температуре от 18 до 25 °С, после чего учесть результаты реакции.

Внимание! *Внесение ТЭ увеличивает разведение образцов в 4 раза, что необходимо учитывать при учете результатов реакции.*

Учет результатов

Результаты титрования учитывают также как при качественном определении.

Титром антител к Treponema pallidum в исследуемом образце считается последнее разведение, в котором получен положительный или слабоположительный результат, умноженное на 4 (учет разведения образца при внесении ТЭ).

Титр антител в исследуемом образце учитывают при условии, что титр антител в $К^+$, полученный в реакции, отличается от указанного в паспорте (1:2560) не более, чем в 2 раза.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неопределенный или отрицательный результаты РПГА можно наблюдать при ранних стадиях сифилитической инфекции, поскольку при раннем первичном сифилисе антитела к возбудителю еще могут быть не обнаружены этим тестом. Неопределенный результат РПГА можно наблюдать также при наличии остаточных антител после эффективного лечения.

При получении неопределенного результата необходимо повторно взять образец для исследования через 2-3 недели с обязательным определением титра антител или с использованием других тестов.

При интерпретации результатов РПГА следует учитывать возможность получения ложноположительных результатов за счет присутствия в образце ревматоидного фактора, EBV, а также при исследовании образцов, полученных от пациентов с генитальным герпесом, боррелиозом, лептоспирозом.

КОПИЯ ВЕРНА
подпись
Борисов В.Ю.
Ген. директор ЗАО «ЭКОЛАБ»
ЭКОлаб

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

Положительный результат РПГА может иметь место как при текущей, так и при перенесенной в прошлом инфекции. Поэтому необходимо обязательное подтверждение положительных результатов теста в дополнительных подтверждающих исследованиях с использованием других специфических тестов (ИФА, иммуноблот, $РИФ_{абс}$)

Если концентрация антител в образце достаточно высока, может наблюдаться эффект прозоны. Для исключения этого, образец перед контролем рекомендуется разводить.

ФОРМА ВЫПУСКА

Выпускается в наборе:

Наименование реагента	Комплект № 1	Комплект № 2
Тест-эритроциты (ТЭ)	1 фл. (8,5 мл)	2 фл. (по 8,5 мл)
Контрольные эритроциты (КЭ)	1 фл. (8,5 мл)	1 фл. (8,5 мл)
Буферный раствор (БР)	1 фл. (20 мл)	1 фл. (25 мл)
Контрольный положительный образец ($К^+$)	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)
Контрольный отрицательный образец ($К^-$)	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)
Планшет для микротитрования на 96 U-образн. лунок	2 шт.	2 шт.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора – 1,5 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1. ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11 – отдел сбыта, 3-30-93 – ОБТК, факс (49643) 3-31-43 и в ФГУ "Государственный научный центр дерматовенерологии Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи" 107076, г. Москва, ул. Короленко, д. 3, строение 6, тел. (499) 785-20-15.

Директор по производству диагностических препаратов ЗАО "ЭКОлаб"
А.Д.Осинская

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики РМАПО
В.В. Долгов

Подпись Долгова
удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись

КОПИЯ ВЕРНА
подпись
Борисов В. Ю.
Ген. директор ЗАО «ЭКОлаб»

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