ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO НАБОРА РЕАГЕНТОВ С ПРИНАДЛЕЖНОСТЯМИ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНЫХ АНТИТЕЛ К ***Treponema pallidum*** В СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ И ЛИКВОРЕ ЧЕЛОВЕКА (**«СифилисИФА-суммарные антитела»**)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СифилисИФА-суммарные антитела» предназначен для качественного иммуноферментного определения суммарных антител к *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) в сыворотке, плазме (с цитратом натрия, гепарином или ЭДТА) крови и ликворе человека.

1.2. Сифилис – хроническое системное инфекционное заболевание с разнообразными клиническими проявлениями (поражения кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей, нервной системы) и последовательной сменой стадий болезни.

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

Возбудителем сифилиса является бактерия вида *Treponema pallidum* (бледная трепонема), относящаяся к семейству *Spirochaetaceae* – грамотрицательный анаэроб, облигатный внутриклеточный паразит, обладающий высоким сродством к тканям лимфатических узлов.

Заражение происходит преимущественно при половых контактах, но возможно также трансплацентарное заражение (врожденный сифилис), риск которого повышен при заражении матери во время беременности или за год до ее наступления. Гораздо реже встречаются трансфузионный (при переливании крови), бытовой (при бытовых контактах) и профессиональный (заражение медицинского персонала при выполнении профессиональных обязанностей) пути передачи.

Основная роль в диагностике сифилиса принадлежит серологическим методам, в основе которых лежит выявление в крови антител к *T. pallidum*, первые из которых появляются через 2-4 недели после заражения. Самым доступным и широко используемым в качестве скринингового и подтверждающего тестов является метод ИФА, обладающий высокими показателями чувствительности и специфичности.

1.3. Функциональное назначение набора «СифилисИФА-суммарные антитела» – скрининг суммарных антител к *T. pallidum* в сыворотке, плазме крови и ликворе человека.

1.4. Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» предназначен для однократного применения.

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

1.5. Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» предназначен для лабораторной диагностики *in vitro*, для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* после специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КДЛ, биолог, медицинский технолог и т.д.).

1.6. Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» предназначен для обследования всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

1.7. Противопоказания к применению набора «СифилисИФА-суммарные антитела» отсутствуют.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «СифилисИФА-суммарные антитела» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы рекомбинантные антигены TpN15, TpN17, TpN47, которые иммобилизованы на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), а также конъюгированы с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата рекомбинантных антигенов TpN15, TpN17 и TpN47 с пероксидазой хрена, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация иммуноглобулинов классов A, G и M к *T. pallidum*, содержащихся в исследуемом образце, на твердую фазу и связывание образовавшегося

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

комплекса с конъюгатом. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой (Рисунок 1).

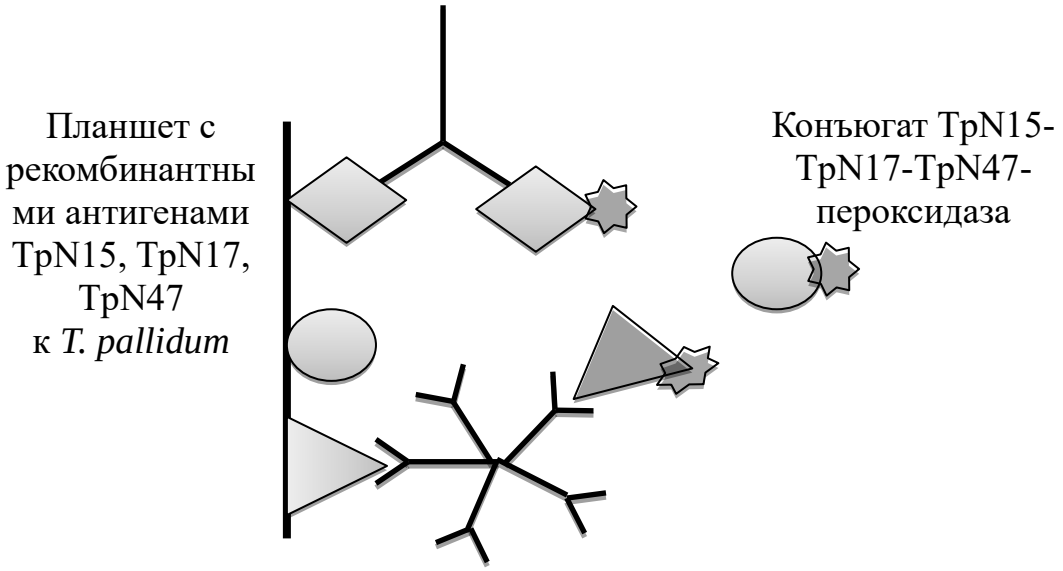


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антител к *T. pallidum* в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие антител к *T. pallidum* в каждом образце оценивают относительно ОПкрит.

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

2.2. Состав и комплектация набора

Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» выпускается в четырех комплектациях[1]:

Комплектация №1: на 96 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei Q.S.» SEAC/Next level, Италия (далее «Alisei») в дубликатах 45 неизвестных проб или в монопликатах 90 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация №2: на 192 определения при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei» в дубликатах 90 неизвестных проб или в монопликатах 180 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация №3: на 480 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei» в дубликатах 225 неизвестных проб или в монопликатах 450 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация №4: на 960 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei» в дубликатах 450 неизвестных проб или в монопликатах 900 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

[1]Допускается постановка анализа на других автоматических анализаторах для ИФА открытого типа, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «СифилисИФА-суммарные антитела» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: 8(812) 677-8779.

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

Обратите внимание, что при каждой постановке анализа **на каждом планшете** обязательно нужно определять оптические плотности (ОП) отрицательной контрольной пробы, положительной контрольной пробы и раствора ТМБ в соответствии со схемой маркировки лунок (**п.7.2.1.1.)**.

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение двух месяцев после вскрытия компонентов набора.*

Основной состав:

- комплект из двенадцати 8-луночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами TpN15, TpN17, TpN47, маркирован «Стрипы с рекомбинантными антигенами *T. pallidum*» – 1, 2, 5 или 10 упаковок в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- отрицательная контрольная проба (ОКП) на основе водно-солевого раствора, не содержащая антител к *T. pallidum.* Флакон маркирован «Отрицательная контрольная проба» – 1, 2 или 4 флакона (по 0,8 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- положительная контрольная проба (ПКП) на основе водно-солевого раствора, содержащая антитела к *T. pallidum*. Флакон маркирован «Положительная контрольная проба» – 1, 2 или 4 флакона (по 0,8 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- конъюгат рекомбинантных антигенов TpN15, TpN17 иTpN47 с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е» – 1, 2, 4 или 8 флаконов (по 16 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

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

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Н (20Х)» – 1, 2 флакона (по 50 мл) или 3, 5 флаконов (по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- раствор тетраметилбензидина, содержащий тетраметилбензидин, перекись водорода и стабилизаторы, маркирован «Раствор ТМБ» – 1, 2 флакона (по 14 мл) или 1, 2 флакона (по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- стоп-реагент, 3,59% раствор соляной кислоты, маркирован «Стоп-реагент» – 1, 2 флакона (по 50 мл) или 3, 5 флаконов (по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- одноразовая ванночка – 2 шт для комплектаций №1, №2 или 4 шт для комплектаций №3, №4;
- одноразовый наконечник – 16 шт для комплектаций №1, №2 или 32 шт для комплектаций №3, №4.

Принадлежности:

- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1, 2, 5 или 10 шт.

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

Таблица 1

Кат. номер		**200-50**	**200-51**	**200-52**	**200-53**
Название компонента	Цветовая кодировка компонента	Комплектация №1	Комплектация №2	Комплектация №3	Комплектация №4
Стрипы с рекомбина-нтными антигенами *T. pallidum*	-	1 шт	2 шт	5 шт	10 шт
Отрицательная контрольная проба (ОКП)	Жидкость желтого цвета	1 фл - 0,8 мл	1 фл - 0,8 мл	2 фл по 0,8 мл	4 фл по 0,8 мл
Положительная контрольная проба (ПКП)	Жидкость красного цвета	1 фл - 0,8 мл	1 фл - 0,8 мл	2 фл по 0,8 мл	4 фл по 0,8 мл
Конъюгат Е	Жидкость темно-зеленого цвета	1 фл - 16 мл	2 фл по 16 мл	4 фл по 16 мл	8 фл по 16 мл
Буфер Н (20Х)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл - 50 мл	2 фл по 50 мл	3 фл по 100 мл	5 фл по 100 мл
Раствор ТМБ	Прозрачная бесцветная или светло-голубого цвета, или светло-бурого цвета жидкость	1 фл - 14 мл	2 фл по 14 мл	1 фл - 100 мл	2 фл по 100 мл
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл - 50 мл	2 фл по 50 мл	3 фл по 100 мл	5 фл по 100 мл
Одноразовая ванночка	-	2 шт	2 шт	4 шт	4 шт
Одноразовый наконечник	-	16 шт	16 шт	32 шт	32 шт

В комплект поставки входят: набор реагентов, принадлежности, инструкция по применению, паспорт.

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения антител к *T. pallidum)*. Определяется как диагноз Внутреннего контрольного образца «Внутренний контрольный образец IgA к *T. pallidum*» (ВКО TpN), содержащего минимальный уровень IgA к *T. pallidum*. Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» определяет ВКО TpN как положительный образец. Определяется как диагноз разведения Первого международного стандарта «WHO International Standard 1st IS for human anti-syphilis plasma IgG and IgM», код 05/132 (NIBSC, Великобритания) с минимальной концентрацией антител классов G и M к *T. pallidum*. Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» определяет разведение МС с концентрацией 0,0188 МЕ/мл как положительный образец. Предел обнаружения антител классов G и M к *T. pallidum* в наборе «СифилисИФА-суммарные антитела» не превышает 0,0188 МЕ/мл.

3.2. Аналитическая специфичность. Определяется как способность теста обнаруживать только аналит в присутствии интерферирующих факторов в исследуемом материале. Наличие антикоагулянтов (цитрат натрия, гепарин или ЭДТА) в пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «СифилисИФА-суммарные антитела».

Антитела к *Borrelia burgdorferi, Trichomonas vaginalis, Herpes Simplex Virus, Chlamydia trachomatis* и ревматоидный фактор не имеют перекрестной реактивности в анализе с помощью набора «СифилисИФА-суммарные антитела».

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

Повышение концентрации гемоглобина до 5 мг/мл, билирубина до 100 мкг/мл, сывороточного альбумина до 100 мг/мл или триглицеридов до 10 мг/мл в некоторых пробах сыворотки и плазмы крови, а так же повышение концентрации хлоридов, лактата, глюкозы, билирубина и общего белка в ликворе, не оказывают негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «СифилисИФА-суммарные антитела», но не следует использовать гемолизированные или мутные образцы.

3.3. Коэффициент вариации оптической плотности в одном и том же образце при определении антител к *T.pallidum* с использованием набора «СифилисИФА-суммарные антитела» не превышает 8%.

3.4. Хук-эффект высоких концентраций. При использовании набора «СифилисИФА-суммарные антитела» хук-эффект высоких концентраций суммарных антител к *T. pallidum* не обнаружен вплоть до 4 ед. ОП.

3.5. Диагностическая чувствительность. Определяется как доля полученных положительных результатов в исследуемых образцах, содержащих антитела к *T.pallidum*.

Диагностическая чувствительность набора «СифилисИФА-суммарные антитела» по Стандартной панели предприятия TpN (СПП TpN) из образцов сыворотки и плазмы (с цитратом натрия, гепарином и ЭДТА) крови человека, содержащих суммарные антитела к *T.pallidum* (фирма ООО «Компания Алкор Био», Россия), или по «Антипаллидум–контрольная панель сывороток» (фирма АО «Вектор Бест») составляет 100%.

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

Диагностическая чувствительность набора «СифилисИФА-суммарные антитела» по выборке из 200 образцов, содержащих суммарные антитела к *T. pallidum*, с 95% доверительной вероятностью составляет 98,5%-100%:

Клинический материал	Количество исследованных образцов	Диагностическая чувствительность(с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови	100	97,0%-100%
Плазма крови	75	96,2%-100%
Ликвор	25	88,7%-100%

3.6. Диагностическая специфичность. Определяется как доля полученных отрицательных результатов в исследуемых образцах, не содержащих антител к *T.pallidum*.

Диагностическая специфичность набора «СифилисИФА-суммарные антитела» по Стандартной панели предприятия TpN (СПП TpN) из образцов сыворотки и плазмы (с цитратом натрия, гепарином и ЭДТА) крови человека, не содержащих суммарные антитела к *T.pallidum* (фирма ООО «Компания Алкор Био», Россия), или по «Антипаллидум–контрольная панель сывороток» (фирма АО «Вектор Бест») составляет 100%.

Диагностическая специфичность набора «СифилисИФА-суммарные антитела» по выборке из 200 образцов (в том числе перекрестно-реагирующих образцов беременных женщин, больных с ИППП и пациентов, в чьих пробах обнаружен ревматоидный фактор), не содержащих суммарные антитела к *T. pallidum,* с 95% доверительной вероятностью составляет 98,5%-100%:

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

Клинический материал		Количество исследованных образцов	Диагностическая специфичность(с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови	Перекрестно-реагирующие образцы	60	95,1%-100%
	Слепые образцы	40	92,8%-100%
Плазма крови		75	96,2%-100%
Ликвор		25	88,7%-100%

3.7. Ограничение теста. Пробы пациентов, принимающих накануне сдачи крови лекарственные средства, употребляющих соленую, жирную и острую пищу, употребляющих алкоголь, подверженных стрессам и физическому перенапряжению, для анализа с помощью набора «СифилисИФА-суммарные антитела» использовать недопустимо.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2б (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

4.5. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

4.6. Стоп-реагент представляет собой 3,59% раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.7. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

4.8. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно. Поскольку ИФА чувствителен к ионам металлов, контакт металлических предметов с компонентами набора недопустим.

4.9. Для обработки посуды и оборудования рекомендуется использовать дезинфицирующие средства на основе третичных аминов, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) или спиртов и разрешенные к применению на территории РФ. Использование дезинфицирующих средств на основе активного кислорода и хлора возможно лишь на предстерилизационном этапе, с последующей термической стерилизацией.

4.10. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.11. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.12. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

4.13. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.14. После использования стрипы, контрольные пробы, образцы и все расходные материалы, которые контактировали с образцами во время обработки, хранения или анализа (флаконы, перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и стерилизоваться в автоклаве с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.15. Во время процедуры ручной промывки планшета содержимое лунок необходимо выбрасывать в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов.

4.16. Не использовать набор по истечении срока годности.

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм, 405 нм и 600-630 нм[2];
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37 °С[2];
- автоматическое промывочное устройство(вошер) для иммунологических планшетов[2,3];
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми наконечниками[4] с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными одноразовыми наконечниками[4], позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная или очищенная деионизованная[5];

[2] Допускается использование автоматических анализаторов для ИФА открытого типа с аналогичными характеристиками, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «СифилисИФА-суммарные антитела» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: (812) 677-8779.

[3] При использовании автоматического промывочного устройства необходимо тщательно следить за его состоянием, периодически проверять емкости и соединительные шланги для промывочных буферов на наличие микробиологи-ческого зароста и других загрязнений, проводить техническое обслуживание в соответствии с рекомендациями производителя оборудования

[4] Повторное использование наконечников не допускается. При внесении каждого образца необходимо использовать новый наконечник

[5] В соответствии с ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия» необходимо периодически контролировать качество воды, используемой для приготовления растворов

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

- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- дезинфицирующий раствор на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Дополнительно для проведения анализа в термостате:

- термостат, поддерживающий температуру +37 °С[2].

Дополнительно для проведения анализа на анализаторе «Alisei»:

- автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei»[2];
- многоцелевые полипропиленовые пробирки 12х75 вместимостью 5 мл[6];
- концентрированный водный раствор Триала, 5000-кратный концентрат, маркирован «Триал»[6].

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащей антикоагулянты (цитрат натрия, гепарин или ЭДТА), подтверждена на 25 положительных и 25 отрицательных образцах каждого вида в анализе с помощью набора «СифилисИФА-суммарные антитела».

[6] Компоненты, не входящие в состав набора; поставляются по отдельному заказу.

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

6.2. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт (цитрат натрия, гепарин или ЭДТА). После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.3. Взятие образца ликвора производят в строгом соответствии с утвержденной в установленном порядке процедурой. Пробу помещают с соблюдением правил асептики в пробирки с пробками, свободные от частиц пыли, без ЭДТА и фторида.

6.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.5. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2...8°С не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20 С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

6.6. Образцы ликвора разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 7-ми суток. При исследовании в пределах 1 часа пробу не охлаждают. При исследовании в пределах 3-х часов – хранить на льду. Замораживание не рекомендуется.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18…25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Контрольные пробы готовы к использованию.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Н (20Х) развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 20 раз.

Например: 50 мл буфера Н (20Х) + 950 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию.

7.1.7. Рабочий раствор Триала. Необходимое количество концентрированного раствора Триала развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 5000 раз.

Например: 1 мл Триала + 4999 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°С).

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

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Ручная постановка

На странице 32 приведена схема проведения анализа при ручной постановке.

7.2.1.1. Составить протокол маркировки лунок

Примечание: ОКП пробу обязательно раскапывать в дубликатах. ПКП обязательно раскапывать в трипликатах!

Лунки промаркировать следующим образом:

А1– № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

А2, В1– № 2 - для измерения величины оптической плотности ОКП;

В2, С1, С2– № 3 - для измерения величины оптической плотности ПКП.

Примечание: *в наборе «СифилисИФА-суммарные антитела» рекомендовано проведение анализа в дубликатах. Это позволяет уменьшить вероятность ошибок и получить достоверные результаты. Допускается использование наборов для анализа образцов в монопликатах при условии своевременной поверки и обслуживания измерительного и промывочного оборудования, что позволяет в случае неисправности свести к минимуму их негативное влияние на результат анализа.*

7.2.1.2. Во все лунки, кроме лунки А1, внести по 90 мкл конъюгата Е.

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

7.2.1.3. Внести в соответствующие лунки по 10 мкл контрольных проб, в оставшиеся лунки – по 10 мкл исследуемых образцов в дубликатах или в монопликатах, осторожно перемешивая содержимое лунок с помощью пипетирования (не менее 3 раз). Цвет раствора при этом изменится с темно-зеленого на голубой.

Примечание: *общее время внесения контрольных проб и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.1.4. Инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации:

- Инкубирование стрипов **в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 400-800 об/мин.**
- Инкубирование стрипов **в течение 30 минут без шейкирования при температуре +37°С в термостате** (предварительно встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре).

7.2.1.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов и промыть лунки 8 раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по **п.7.1.4.**, **выдержать в течение 30 секунд** с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок

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

постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства. При автоматической промывке необходимо заполнять лунки полностью и следить за качеством аспирации.

7.2.1.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации с ТМБ:

- **Инкубирование стрипов в темноте в течение 10 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 400–800 об/мин.**
- **Инкубирование стрипов в темноте в течение 15 минут без шейкирования при комнатной температуре (+18…25 °С)**.

7.2.1.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

7.2.1.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения **п. 7.2.1.7.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

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

7.2.2. Постановка на анализаторе «Alisei»

Анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа определения суммарных антител к *T.pallidum* введена в память анализатора.

7.2.2.1. При каждой постановке анализа на каждом планшете обязательно нужно определять ОП ОКП, ПКП и раствора ТМБ.

7.2.2.2. В случае дробного применения набора необходимо извлечь контрольные пробы из автоматического анализатора после их внесения в лунки всех планшетов, участвующих в постановке, и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование контрольных проб, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. После выполнения ручной постановки измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм, рекомендуется использование референсного фильтра 600-630 нм. Если значение оптической плотности в лунках, содержащих ПКП, превышает предел линейного измерения спектрофотометра,

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

считывание результатов провести при 405 нм. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** ОП, полученную на референсном фильтре, из ОП, полученной при 450 нм (или при 405 нм), для каждой лунки.

Рекомендуется вычитать ОП, полученную в лунке с ТМБ, из значений ОП всех остальных лунок.

***Примечание**: значение ОП в лунке с ТМБ при 450 нм не должно превышать 0,1 ед. ОП .*

8.2. Критерии достоверности анализа

Результаты анализа считают достоверными при соблюдении следующих условий:

- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих ОКП, должно быть не более 0,2 ед. ОП;
- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих ПКП, должно быть не менее 0,5 ед. ОП[7].

В случае, если полученные данные выходят за пределы указанных значений, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Определить допустимый диапазон разброса значений ОП ПКП, для чего умножить среднее арифметическое значение ОП ПКП на 0,7 и 1,3. Сравнить ОП в каждой лунке с расчетным диапазоном. Оптическая плотность каждой лунки, содержащей ПКП, должна попадать в полученный диапазон. Если значение ОП в одной из лунок

[7]В случае если два значения ОП ПКП из трех не удовлетворяют критерию, анализ следует повторить.

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

не удовлетворяет этому критерию, то это значение можно исключить только в том случае, если ни одно из значений ОП не было исключено ранее, в противном случае результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9.2. Определить значение ОПкрит., для чего к среднему значению[8] ОП ОКП прибавить Ккрит.

Ккрит. – коэффициент, определяемый на предприятии-изготовителе и указанный в аналитическом паспорте.

$$\textbf{ОПкрит.} = \textbf{ОП}_{\textbf{окп}} + \textbf{Ккрит}.$$

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если ОП образца **менее или равна ОПкрит**., то считают, что исследуемый образец не содержит суммарные антитела к *T. pallidum* **(отрицательный).**

Если ОП образца **более ОПкрит**., то образец должен быть исследован повторно в дубликатах. **Только при получении аналогичных результатов считают, что образец содержит** суммарные антитела к *T. pallidum* **(положительный)**.

Следует учитывать, что при отсутствии инфекции существует вероятность получения ложноположительного результата, например, при аутоиммунных заболеваниях, при беременности, при доброкачественных/злокачественных трансформациях клеток и т.п.

[8]Для расчета средних значений ОП ОКП использовать только те значения, которые удовлетворяют критериям достоверности.

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

При наличии инфекции существует вероятность получения ложноотрицательного результата, например, на ранних стадиях сероконверсии, при иммунодефиците, для иммунносупрессированных пациентов или пациентов на гемодиализе. Ни один из известных методов тестирования не дает полной гарантии отсутствия инфекции.

Исключения случайной ошибки добиваются перестановкой в дубликатах. Положительный результат требует подтверждения референсными методами.

В силу разнообразия используемого сырья, широкого спектра иммунологических реакций в образцах пациентов, тесты разных производителей могут давать различающиеся результаты для одних и тех же проб.

Основанием для постановки диагноза не может служить результат единичной постановки ИФА. Диагноз устанавливается по совокупности клинических и лабораторных данных.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Набор «СифилисИФА-суммарные антитела» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2... 8 °С в течение всего срока годности.

Срок годности набора — 12 месяцев.

11.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

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

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пакет закрывающийся полиэтиленовый и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8 °С не более двух месяцев;
- контрольные пробы, конъюгат Е после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8 °С не более двух месяцев;
- раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8 °С не более шести месяцев;
- стоп-реагент, концентрированные водно-солевой раствор для промывки лунок и раствор Триала после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8 °С в течение всего срока годности;
- водно-солевой раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...8 °С не более четырех недель;
- рабочий раствор Триала, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25 °С) не более 5 суток.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента на каждом планшете необходимо определение оптических плотностей ОКП, ПКП, раствора ТМБ.
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

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

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения;
- запрещается повторное использование контрольных проб, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности.

11.5. Не допускается повторное использование планшетов для предварительного нанесения образцов, в том числе, после использования дезинфицирующих и/или моющих средств для их очистки.

11.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов. Запрещается смешивать растворы ТМБ с различными буквенными обозначениями в серии.

11.7. Запрещается использовать промывочные растворы, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

11.8. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

11.9. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

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

11.10. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

11.11. Таблица расхода реагентов (при постановке ИФА вручную)

Название компонента	3 стрипа	6 стрипов	9 стрипов	12 стрипов
Конъюгат Е	3 мл	6 мл	9 мл	12 мл
Буфер Н (20Х)	12 мл (+228 мл Н2О) = 240 мл	24 мл (+456 мл Н2О) = 480 мл	36 мл (+684 мл Н2О) = 720 мл	50 мл (+950 мл Н2О) = 1000 мл
Буфер Н (1Х рабочий раствор)				
Раствор ТМБ	3,5 мл	7 мл	10,5 мл	14 мл
Стоп-реагент	3,5 мл	7 мл	10,5 мл	14 мл

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре +2...8 °С. Допускается транспортирование набора при температуре до +25 °С не более 7 суток, в том числе при температуре +37 °С не более 1 суток.

12.2. Набор, транспортированный с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

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

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

13.1. При утилизации наборы должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

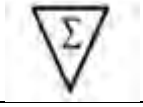
13.2. При использовании набора образуются отходы классов А, В и Г, которые утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «СифилисИФА-суммарные антитела» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, лит. А, тел/факс: 8(812) 677-8779.

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

15. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

IVD	Только для диагностики *in vitro*		Количество тестов
REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Номер серии		Срок годности
	Производитель		Хранить при
	Дата изготовления		Биологическая опасность
	Обратитесь к инструкции по применению		Беречь от влаги

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-280-98539446-2017.

Примечания к Схеме проведения анализа (стр. 32):

КП — контрольная проба;

КТ — комнатная температура (+18...25 °С);

ОП — оптическая плотность;

ПО — программное обеспечение.

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА
(только для ручной постановки)

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	**90 мкл** конъюгата	**КТ**	Внесение контрольных проб и исследуемых образцов не более 15’	В лунку для определения ОП ТМБ ничего не вносить. Вносить ОКП в дубликатах, ПКП – в триплКП и образцов перемешивать содержимое лунок с помощью пипетирования
2		**10 мкл** *КП*			
3		**10 мкл** *исследуемых образцов*			
4	**Инкубация**	—	**+37°С**	30’	**Термостатируемый шейкер**, 400-800 об/мин
					Перед инкубацией перемешать. **Термостат,** без шейкирования
5	Промывка	**300** мкл в лунку **1*_промывочного раствора_** (8 раз) с выдержкой 30 сек			**1***промывочный раствор = 50 мл буфер Н (20Х) + 950 мл H_2O
6	Внесение хромогена	**100 мкл** *ТМБ*			
7	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	15’	В темноте, без шейкирования
			+37°С	10’	**Термостатируемый шейкер**, 400-800 об/мин
8	Остановка ферментной реакции	**100 мкл** *стоп-реагента*			
9	Перемешивание	—	**КТ**	20-30’’	**Постукивание рамки**
				1-2’	**Шейкер**
10	Регистрация результатов	—		В течение 20’ после остановки ферментной реакции	**Фотометр** 450 нм, 405 нм и 600-630 нм
11	Обработка Результатов				Калькулятор, соответствующее ПО