ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СУММАРНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССОВ A, G и M К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИФИЛИСА «TREPONEMA PALLIDUM» В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

«ИФА-Сиф-суммарный»

Комплект 3

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
СП ООО «Фармлэнд»
И.А.Ильин
"05" 04 2024 г.

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для одновременного выявления антител классов A, G и M к Treponema pallidum в сыворотке или плазме крови человека "in vitro" методом твердофазного иммуноферментного «сэндвич»-анализа.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	2 шт.
Положительный контрольный образец ($К^+$)	1 флакон, 2 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$)	2 флакона по 3 мл
Конъюгат (Кг)	1 флакон, 0,75 мл
Раствор для разведения конъюгата (РР-К)	1 или 2 флакона по 6 мл
Раствор хромогена (РХ)	2 флакона по 13 мл
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25)	2 флакона по 28 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 12 мл
Комплект ванночки для реагентов с наконечниками для многоканальных пипеток (ванночка – 1 шт., наконечники – 8 шт.)	1 шт.
Клейкая пленка	4 шт.

2.2 Основные компоненты набора «ИФА-Сиф-суммарный» – иммуносорбент и конъюгат.

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов p17 и tmpA, являющихся аналогами белков Treponema pallidum.

Конъюгат представляет собой смесь рекомбинантных белков p17 и tmpA Treponema pallidum, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Положительный контрольный образец – сыворотка крови человека, содержащая антитела к Treponema pallidum, не содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусу гепатита С и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к Treponema pallidum, ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

При внесении в лунки планшета образцов сывороток инфицированной крови и раствора Кг в рабочем разведении специфичные к Treponema pallidum антитела связываются как с рекомбинантными антигенами, сорбированными на твердой фазе, так и с антигенами, входящими в состав конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена ТМБ.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,9 М раствор серной кислоты), и интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм.

Величина ОП прямо пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы крови человека. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение **24 постановок** ИФА: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Всего – **192 определений**, включая контрольные образцы.

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

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

3.2 Стоп-реагент, содержащий серную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

4 Правила работы с набором

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение 15 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8) °С до 48 ч. Замороженные образцы (желательно до температуры не менее минус 20 °С) можно хранить до 3 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, содержащими азид натрия, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- всю используемую для приготовления реагентов посуду не обрабатывать дезрастворами и моющими средствами. В случае необходимости промыть водой питьевой проточной, а затем пять раз ополоснуть дистиллированной водой;
- для работы с РХ необходимо использовать отдельные емкости для растворов и наконечники для пипеток;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с. Не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для раствора для промывания планшета и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста;
- необходимо использовать пипетки автоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором с объемной долей спирта этилового 70 %. Не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником;
- при внесении в лунки раствора Кг в рабочем разведении нельзя касаться наконечником пипетки поверхности планшета и раствора, находящегося в лунках;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- суховоздушный термостат типа ТС-80 М2, поддерживающий температуру (37±1) °С, или аналогичный ему по характеристикам;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 5,0 мл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,5 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
- колба лабораторная вместимостью 1000 мл;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей спирта этилового 70 %;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода деионизированная или дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток (плазмы) и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

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

Расход реагентов набора для постановки анализа, который определяется количеством используемых стрипов, приведен в таблице А.1 Приложения А.

6.2 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев.

6.3 Приготовление раствора для промывания планшета

Внимание! Раствор для промывания планшета готовить за 15 мин до начала проведения анализа!

Если флакон с ФСБ-Т×25 содержит осадок, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (37±1) °С до полного растворения осадка.

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флакона с ФСБ-Т×25, затем добавить дистиллированной воды до метки 700 мл и аккуратно перемешать раствор. Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 72ч.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с ФСБ-Т×25 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимый объем раствора (таблица А.1 Приложения А) в мерный стакан или цилиндр, добавить необходимое количество дистиллированной воды и перемешать раствор.

Неиспользованный ФСБ-Т×25 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.4 Подготовка $К^+$, $К^-$, РР-К, РХ и стоп-реагента

$К^+$, $К^-$, РР-К, РХ и стоп-реагент готовы к использованию.

Внимание! Необходимо исключить воздействие прямого солнечного света на флакон с РХ!

Неиспользованные РР-К, РХ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Остаток $К^+$ и $К^-$ после вскрытия флакона можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.5 Приготовление раствора Кг в рабочем разведении

Из флакона с Кг отобрать указанный в таблице А.1 Приложения А объем и перенести во флакон с РР-К. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон отобрать необходимое количество РР-К, добавить Кг в соответствии с таблицей А.1 Приложения А и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Раствор Кг в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор Кг в рабочем разведении можно хранить в течение 10 мин при температуре (18-25) °С. При смешивании РР-К и Кг во флаконе допускается появление осадка. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать. Использовать только новую ванночку для реагентов и новые наконечники!

Остаток Кг можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

7 Требования к промыванию планшета

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них;
- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;
- необходимо выдерживать лунки, заполненными раствором для промывания планшета, в течение 30 с;
- при каждой аспирации тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 В одну лунку планшета внести **0,05 мл** (50 мкл) $К^+$, в две другие лунки планшета – по **0,05 мл** (50 мкл) $К^-$.

В остальные лунки планшета внести по **0,05 мл** (50 мкл) неразведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека.

Внимание! Общее время внесения контрольных и исследуемых образцов не должно превышать (5-10) мин! Каждый образец необходимо отбирать одноразовым наконечником!

8.2 Внести во все лунки планшета по **0,05 мл** (50 мкл) раствора Кг в рабочем разведении (п 6.5). Необходимое количество раствора Кг в рабочем разведении перед внесением перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую одноразовую ванночку для реагентов.

Содержимое лунок перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, при этом желто-зеленый цвет раствора Кг в рабочем разведении должен измениться на голубой.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения раствора Кг в рабочем разведении, контрольных и исследуемых образцов в лунки планшета (п. 9.1).

8.3 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин**. Допускается инкубация на шейкере при температуре **(37±1) °С в течение 20 мин** при частоте вращения платформы 500 об/мин.

8.4 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.3) **пять раз.** При промывании во все лунки необходимо внести (0,30-0,35) мл раствора. По окончании промы-

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

вания тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена.

8.5 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) РХ. Необходимое количество РХ перед внесением перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую одноразовую ванночку для реагентов.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РХ в лунки планшета (п. 9.2).

8.6 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С** в защищенном от света месте в течение **10 мин**.

Внимание! По окончании инкубации в лунках с образцами сывороток (плазмы) крови, содержащими антитела к Treponema pallidum, произойдет изменение окраски раствора различной интенсивности в зависимости от концентрации антител в исследуемом образце сыворотки от розовой до синей.

8.7 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 0,05 мл (50 мкл) стоп-реагента.

Внимание! В лунках с образцами сывороток (плазмы) крови, содержащими антитела к Treponema pallidum, произойдет изменение окраски раствора с синей на желтую.

8.8 Не позже чем через 40 мин после остановки реакции определить значение ОП раствора в лунках в двухволновом режиме – 450 нм относительно (620-700) нм.

9 Оптический контроль точности внесение реагентов в лунки планшета

9.1 Значение ОП раствора в лунке, содержащей контрольный или исследуемый образец и раствор Кг в рабочем разведении, измеренное при длине волны **450 нм**, должно быть **более 0,10 ОЕ** (п.8.6).

9.2 Значение ОП раствора в лунке после внесения раствора РХ, измеренное при длине волны **490 нм**, должно быть **более 0,08 ОЕ**.

10 Обработка результатов анализа

10.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с $К^-$ – ОПср $К^-$, ОЕ.

10.2 Результаты учитывать только в том случае если:

- значение ОП в лунке с $К^+$ – ОП $К^+$ – не менее 0,4 ОЕ;
- значение ОПср $К^-$ – не более 0,2 ОЕ.

10.3 При соблюдении выше перечисленных условий рассчитать критическое значение (ОПкрит.), ОЕ, по формуле (1):

$$ОПкрит. = ОПср\ К^- + \mathbf{0,15} \quad (1).$$

10.4 Рассчитать для каждого исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови значение коэффициента позитивности (КП) по формуле (2):

$$КП = \frac{ОП\ образца}{ОПкрит.} \quad (2).$$

Результат анализа считать **положительным** (в сыворотке (плазме) крови присутствуют антитела к Treponema pallidum), если значение КП исследуемого образца больше **1,0**.

Результат анализа считать **отрицательным**, если значение КП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови меньше или равно **1,0**.

При получении положительного результата этот же образец сыворотки (плазмы) крови исследовать повторно не менее чем в двух лунках набора. Повторное получение положительного результата свидетельствует о том, что в сыворотке (плазме) крови присутствуют антитела к Treponema pallidum.

Если при повторной постановке получен отрицательный результат, то данный образец считать сомнительным и передать для дальнейшего изучения другими методами.

Чувствительность и специфичность набора реагентов «ИФА-Сиф-суммарный» -100 % для панели сывороток Стандарт АТ(+/-)Т.pallidum. Стандартная панель сывороток, содержащих и не содержащих антитела к Treponema pallidum. Кат№ IBS-24 ЗАО «МБС»

11 Форма выпуска набора

11.1 Набор поставляется варианте комплектации: комплект 3 – для проведения анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение **24 постановок** ИФА на **2 разборных** планшетах: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Всего – **192 определений**, включая контрольные образцы;

12 Условия хранения и применения набора

12.1 Набор транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование набора при температуре до +27 °С не более 5 суток.

12.2 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +27 °С не более 5 суток.

12.3 Запрещается замораживать компоненты набора.

12.4 Срок годности набора – 24 месяца.

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

Приложение А

Таблица А.1 – Расход реагентов набора для постановки ИФА

Объем реагента, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление раствора для промывания планшета												
ФСБ-Т×25	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**	**16**	**18**	**20**	**22**	**28**
Дистиллированная вода	**до 50**	**до 100**	**до 150**	**до 240**	**до 250**	**до 300**	**до 350**	**до 400**	**до 450**	**до 500**	**до 550**	**до 700**
Приготовление раствора Кг в рабочем разведении												
РР-К	**0,5**	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**	**3,5**	**4,0**	**4,5**	**5,0**	**5,5**	**6,0**
Кг	**0,033**	**0,068**	**0,100**	**0,133**	**0,165**	**0,200**	**0,230**	**0,270**	**0,300**	**0,330**	**0,370**	**0,400**

Изготовитель: СП ООО «Фармлэнд»
Юридический адрес: Республика Беларусь, 222603, Минская обл., г. Несвиж, ул. Ленинская, д. 124, к. 3
Почтовый адрес: Республика Беларусь, 220113, г. Минск, ул. Восточная, д. 129. Тел/факс +375-17- 3733190
По вопросам применения и качества набора обращаться на предприятие-изготовитель СП ООО «Фармлэнд».

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