

Унитарное предприятие  
"Хозрасчетное опытное производство  
Института биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси"  
Республика Беларусь  
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3  
Факс (37517) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ  
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К  
ВОЗБУДИТЕЛЮ СИФИЛИСА *TREPONEMA PALLIDUM*  
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**ИФА-ТРЕП  
Набор Т2-монологит**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра  
здравоохранения РБ  
\_\_\_\_\_ А.С.Романенков  
"01" октября 2003 г.

**1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА**

1.1 Набор предназначен для первичного анализа сывороток и плазмы крови на наличие антител к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum* методом иммуноферментного анализа.

**2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

**2.1 Состав набора:**

Название компонента	Количество
1 Концентрат раствора для промывания планшетов (раствор №1)	2 фл. по 25 мл
2 Иммуносорбент	2 планшета
3 Раствор для разведения сывороток (раствор №3)	1 фл., 20 мл
4 Раствор для разведения конъюгата (раствор №4)	1 фл., 26 мл
5 Концентрат раствора для приготовления проявителя (раствор №5Т)	1 фл., 14 мл
6 Конъюгат иммуноферментный	1 ампула, (1,0-2,0) мл
7 Хромоген ТМБ (тетраметилбензидин)	1 флакон
8 Положительная контрольная сыворотка (K <sup>+</sup> )	1 ампула, 0,12 мл
9 Отрицательная контрольная сыворотка (K <sup>-</sup> )	1 ампула, 0,15 мл
10 Стоп-реагент	1 фл., 14 мл

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-ТРЕП" – иммуносорбент и конъюгат иммуноферментный. Иммуносорбент представляет собой полистирольный или полихлорвиниловый планшет, лунки которого сенсibilизированы рекомбинантными белками Trp 15, Trp 17, Trp 41, Trp 47 – аналогами белков *Treponema pallidum*. Конъюгат представляет собой рекомбинантный белок А (аналог белка *A Staphylococcus aureus*), конъюгированный с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфические к *Treponema pallidum*, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи иммуноферментного конъюгата. После отмывки несвязанных компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (2М раствор серной кислоты) и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках, которая при длине волны 450 нм пропорциональна концентрации специфических антител в образцах сыворотки или плазмы крови.

2.3 Набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроли).

**3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ**

3.1 Специфические антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях *E.coli* и содержащиеся в наборе "ИФА-ТРЕП" являются биологически безопасными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), 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 (согласно приказа № 351 от 16.12.1998 г. МЗ РБ);
- не пипетировать растворы ртом;
- все жидкие отходы необходимо обрабатывать раствором с массовой долей перекиси водорода 6% при комнатной температуре в течение 3 часов;
- все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и затем автоклавировать в течение 1 часа при температуре 120 °С;
- инструменты и оборудование, а также рабочие поверхности, на которых проводился анализ, необходимо до и после работы протирать раствором с объемной долей этилового спирта 70%, либо другими синтетическими средствами вируцидного действия.

**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 (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 часов. Если нет возможности провести анализ в этот срок, образцы необходимо заморозить (желательно до температуры ниже -20 °С). При этом следует избегать замораживания образцов более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден 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;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

**5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,  
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
  - пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,020 до 0,400 мл (от 20 до 400 мкл);
  - пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
  - суховоздушный термостат на 37 °С;
  - мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
  - стакан мерный вместимостью 1000 мл;
  - ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
  - флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
  - клейкая пленка или крышка;
  - вата медицинская гигроскопическая;
  - бумага фильтровальная;
  - перчатки резиновые хирургические;
  - раствор с объемной долей этилового спирта 70%;
  - раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
  - вода дистиллированная;
  - контейнер для сбора твердых отходов;
  - контейнер для слива жидких отходов.

**6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА**

(из расчета на 96 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета (раствор №1).

Содержимое флакона концентрата раствора №1 интенсивно встряхнуть, отобрать 16 мл раствора в мерный стакан вместимостью 1000 мл, добавить 700 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Если концентрат раствора №1 содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

### 6.3 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отобрать 12,0 мл раствора №4 для разведения конъюгата и добавить 0,2 мл (200 мкл)\* конъюгата. Содержимое флакона перемешать, не допуская образования пены.

**ВНИМАНИЕ!** Раствор готовят непосредственно перед использованием!

\*Примечание: объем конъюгата может меняться.

### 6.4 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон вместимостью 20 мл внести 6,0 мл раствора хромогена ТМБ и добавить 6,0 мл раствора №5Т для приготовления проявителя, закрыть флакон крышкой и тщательно перемешать в течение (20-30) сек.

**ВНИМАНИЕ!** Раствор готовят непосредственно перед использованием!

## 7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

- 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; лунки должны заполняться до краев (0,350 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

## 8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Приготовить раствор №1 как описано в п.6.2.

8.2 Перед началом работы планшет освободить от упаковочного пакета, внести во все лунки по 0,350 мл (350 мкл) раствора №1, выдержать планшет залитым в течение (30-40) сек и удалить раствор из лунок при помощи вошера. От остатков влаги избавиться, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3 В каждую лунку планшета внести по 0,080 мл (80 мкл) раствора №3.

8.4 В лунки планшета внести по 0,020 мл (20 мкл) образцов исследуемых сывороток, оставив свободными пять лунок первого ряда.

В две лунки (А<sub>1</sub> - В<sub>1</sub>) внести по 0,020 мл (20 мкл) положительной контрольной сыворотки (К<sup>+</sup>).

В три лунки (С<sub>1</sub>-Е<sub>1</sub>) внести по 0,020 мл (20 мкл) отрицательной контрольной сыворотки (К<sup>-</sup>).

При внесении сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках. Во время пипетирования происходит изменение цвета раствора.

8.5 Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин.

8.6 После окончания инкубации удалить раствор реагентов из лунок планшета и промыть лунки четыре раза раствором №1.

После последней аспирации удалить влагу, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.7 Приготовить раствор конъюгата, согласно п.6.3.

8.8 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата, накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

8.9 После окончания инкубации удалить раствор конъюгата из лунок при помощи вошера и промыть лунки шесть раз раствором №1. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.10 Приготовить раствор проявителя (см.п. 6.4.)

8.11 Внести в лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя. Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в темном месте при температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

8.12 Остановить цветную реакцию внесением во все лунки планшета по 0,050 мл (50 мкл) раствора стоп-реагента. Не позже чем через 1 мин определить оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм).

## 9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с отрицательной контрольной сывороткой (ОПК<sup>-</sup>) и для лунок с положительной контрольной сывороткой (ОПК<sup>+</sup>).

Проведение анализа в считается корректным, если среднее значение ОП (К<sup>-</sup>) не выше 0,1 ОЕ, среднее значение ОП (К<sup>+</sup>) не ниже 0,6 ОЕ.

Если одно из трех значений ОП (К<sup>-</sup>) больше 0,1ОЕ, его не учитывают и ОПср (К<sup>-</sup>) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (К<sup>-</sup>).

9.2 Расчет параметров граничного значения (ГЗ) ОП.

Граничное значение ОП (ГЗ). ГЗ рассчитывают, добавляя константную величину 0,12\* к значению ОПср (К<sup>-</sup>).

\*Примечание: константная величина может меняться.

9.3 "Серая зона" – зона значений ОП, которая находится в промежутке от ГЗ до значений, меньших ГЗ на 10%.

9.4 Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП "серой зоны".

9.5 Результаты считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ.

9.6 Образцы со значениями ОП в пределах "серой зоны" считаются неопределенными.

9.7 Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать повторно не менее, чем в двух лунках набора: образцы положительные в одной или больше лунках, следует считать положительными; образцы отрицательные в двух и более лунках, следует считать отрицательными.

## 10 ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА

10.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

Набор Т2 – монолит: монолитный планшет; хромоген – раствор ТМБ; набор рассчитан на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: одна постановка – один планшет (96 лунок).

Набор Т12 – стрип: стриповый планшет; хромоген – раствор ТМБ; набор рассчитан на проведение 12 постановок иммуноферментного анализа: одна постановка – один стрип (16 лунок).

## 11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

11.2 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

11.3 Срок годности набора - 12 месяцев.