



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 РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИФИЛИСА *TRERONEMA PALLIDUM*
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

**ИФА-ТРЕП
Набор Т12-стрип**

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
06.07.2007 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
1 Концентрат раствора для промывания планшетов (КРП)	3 флакона по 25 мл
2 Иммуносорбент	2 планшета
3 Раствор для разведения сывороток (РРС)	1 флакон, 20 мл
4 Раствор для разведения конъюгата (РРК)	1 флакон, 26 мл
5 Субстратный буферный раствор (СБР)	1 флакон, 14 мл
6 Конъюгат	1 микропробирка; 0,6 мл
7 Раствор ТМБ (хромоген 3,3',5,5'-тетраметил-бензидин)	1 флакон, 14 мл
8 Положительная контрольная сыворотка (К ⁺)	1 микропробирка; 0,6 мл
9 Отрицательная контрольная сыворотка (К ⁻)	1 микропробирка; 0,9 мл
10 Стоп-реагент	1 флакон, 25 мл

2.2 Основные компоненты набора ИФА-ТРЕП – иммуносорбент и конъюгат. Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, лунки которого сенсibilизированы рекомбинантными белками Trp 15, Trp 17, Trp 41, Trp 47 – аналогами белков *Treponema pallidum*. Конъюгат представляет собой моноклональные антитела против иммуноглобулинов класса IgG человека, конъюгированные 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 конъюгата. После отмывания несвязанных компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5М 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.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные че-

ловеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить 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].

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

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

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 хранить при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Если нет возможности провести анализ в этот срок, образцы необходимо заморозить (желательно до температуры ниже минус 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 использовать набор после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента использовать отдельную емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускать подсыхания 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 установленный на температуру 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;
 - бумага фильтровальная;
 - перчатки резиновые хирургические;
 - вода дистиллированная;
 - контейнер для сбора твердых отходов;
 - контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 16 лунок)

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

6.2 Приготовление промывочного раствора

6.2.1 Если КРП содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть, отобрать 6 мл раствора в мерный стакан вместимостью 500 мл, добавить 270 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

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

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении

6.3.1 В чистый флакон отобрать 2,0 мл РРК и добавить 0,04 мл (40 мкл) конъюгата. Содержимое флакона перемешать, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор готовят непосредственно перед использованием!

6.4 Приготовление раствора проявителя

6.4.1 В чистый флакон внести 1,0 мл раствора ТМБ и добавить 1,0 мл СБР. Смесь интенсивно встряхнуть.

ВНИМАНИЕ! Раствор ТМБ готовят непосредственно перед использованием!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

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; 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 Перед началом работы необходимое количество стрипов освободить от упаковочного пакета, вставить в рамку.

8.2 В каждую лунку стрипов внести по 0,080 мл (80 мкл) РРК.

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

В две лунки (А₁ - В₁) внести по 0,020 мл (20 мкл) (K⁺).

В три лунки (С₁-Е₁) внести по 0,020 мл (20 мкл) (K⁻).

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

8.4 Накрывать стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин.

8.5 После окончания инкубации удалить раствор реагентов из лунок стрипов и промыть лунки четыре раза промывочным раствором.

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

8.6 Во все лунки стрипов внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата, приготовленного по п.6.3, накрыть стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

8.7 После окончания инкубации удалить раствор конъюгата из лунок при помощи вошера и промыть лунки шесть раз промывочным раствором, приготовленным по п.6.2. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.8 Внести в лунки стрипов по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя, приготовленного по п.6.4. Накрывать стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в темном месте при температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

8.9 Остановить цветную реакцию внесением во все лунки стрипов по 0,100 мл (100 мкл) раствора стоп-реагента. Не позже чем через 1 мин определить оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм) или в одноволновом режиме при длине волны 450 нм.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать среднее арифметическое значение ОП для лунок с (K⁻) – ОП_{ср} (K⁻) и для лунок с (K⁺) – ОП_{ср} (K⁺).

Если одно из трех значений ОП (K⁻) больше 0,1ОЕ, его не учитывают и ОП_{ср} (K⁻) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (K⁻).

Проведение анализа считается корректным, если ОП_{ср} (K⁻) не выше 0,1 ОЕ, ОП_{ср} (K⁺) не ниже 0,6 ОЕ.

9.2 Расчет параметров граничного значения (ГЗ) ОП и "серой зоны"

ГЗ рассчитывают, добавляя константную величину 0,12 к значению ОП_{ср} (K⁻).

"Серая зона" – зона значений ОП, которая находится в промежутке от уровня ГЗ до значения, которое меньше этого уровня на 10%.

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

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

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

9.6 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:

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

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

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Набор транспортируют 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.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы