

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления иммуноглобулинов
класса G к возбудителю сифилиса

Treponema pallidum

«ТрепонемаСкрин»

ФСР 2010/08587

Е-0446 **ТрепонемаСкрин**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ТрепонемаСкрин» предназначен для выявления антител класса G к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum* в сыворотке/плазме крови или ликворе человека методом иммуноферментного анализа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

На поверхности лунок полистироловых планшетов адсорбирована смесь очищенных рекомбинантных полипептидов - аналогов липопротеидов оболочки *Treponema pallidum*: p15, p17, TmpA, p47.

Положительный контрольный образец инактивированный K⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к белкам возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* и не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K⁻ представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител к белкам возбудителя сифилиса *Treponema pallidum*, к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена. Поставляется в виде концентрата.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Стоп-реагент представляет собой 1М раствор серной кислоты.

При инкубации образцов сыворотки в лунках планшета специфические к *Treponema pallidum* антитела связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. После удаления несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - мышиные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После удаления несвязанных молекул конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Содержащийся в конъюгате фермент катализирует разложение субстрата, что приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию специфических к *Treponema pallidum* антител в исследуемом образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм).

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты, упакованные в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	2 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный K⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,5 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный K⁻	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	0,5 мл 1 пробирка
Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	от 0,5 до 1,5 мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для отмывания планшетов (x25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от 35 °С до 37 °С в течение 30 минут.	25 мл 2 флакона
Раствор № 2 для разведения сывороток	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор № 3 для разведения конъюгата	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	25 мл 1 флакон
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	2,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон

Один набор рассчитан на проведение 192 анализов сыворотки (плазмы) крови, включая контрольные, или 48 образцов ликвора.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, стоковыми растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при 121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70% раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- дистиллированная или деионизованная вода;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 5 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- пипетки 8- или 12-канальные автоматические со сменными наконечниками позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 100 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- центрифуга настольная на 3-10 тыс. об/мин для получения и осветления образцов сыворотки/плазмы крови или ликвора в микропробирках;
- микропробирки полипропиленовые чистые или планшеты для микротитрования (не использованные ранее!) для предварительного отбора испытуемых образцов;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью 1,5-2,2 мл для хранения и осветления образцов сыворотки/плазмы;
- мерный стакан или цилиндр вместимостью 250-500 мл;
- мерная посуда вместимостью до 25 мл;

- воздушный термостат на 37°С;
- аппарат для промывания планшетов;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм);
- контейнер для сброса твердых отходов;
- контейнер для слива использованных жидкостей;
- автоклав для инактивации отходов;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- пленка полиэтиленовая.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме 20 мкл или образцы ликвора в объеме 50 мкл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием 10 ± 1 мин при 2500-3000 об/мин. Собранные образцы сыворотки/плазмы и ликвора хранить при температуре от 4°С до 6°С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше минус 15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

5.1. С целью одновременного внесения испытуемых образцов в рабочий планшет с иммуносорбентом следует предварительно внести по 50 мкл образцов сывороток или по 70 мкл образцов ликвора в лунки дополнительного планшета, не содержащего иммуносорбента.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

При инкубациях не располагать планшеты стопкой!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более четырех планшетов.

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ (для проведения 8 анализов)

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в таблице № 1:

Таблица № 1. Условия и сроки хранения компонентов.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 °С до 8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 3, № 4, хромоген	от 2 °С до 8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 °С до 8 °С	До окончания срока годности набора

Перед началом работы набор необходимо выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Растворы № 2, № 3, K⁺, K⁻, стоп-реагент поставляются в готовом виде. Перед использованием флаконы с растворами № 2, № 3, пробирки с контрольными образцами K⁺ и K⁻ интенсивно встряхнуть.

6.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов его следует прогреть перед разведением при температуре от 35 °С до 37 °С до полного растворения.

2 мл концентрата раствора № 1 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 50 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от 4 °С до 12 °С или 4 часа при температуре от 18 °С до 24 °С.

6.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата

а) При проведении исследований сывороток или плазмы крови из пробирки с концентратом конъюгата отобрать _____ мкл в чистую емкость и добавить 1 мл раствора № 3. Тщательно перемешать.

б) При проведении исследований образцов ликвора из пробирки с концентратом конъюгата отобрать _____ мкл в чистую емкость и добавить 1 мл раствора № 3. Тщательно перемешать.

Готовый раствор конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от 9 °С до 25 °С в защищенном от света месте.

6.3. Приготовление индикаторного раствора

Отобрать 1 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 100 мкл хромогена. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе

пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Освободить планшет из упаковки и оставить в каретке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице 1.

7.1. Рабочий планшет с иммобилизованными антигенами (иммуносорбент) перед использованием однократно промыть раствором № 1 автоматическим или ручным промывателем, полностью заполняя лунку раствором (по 250 мкл) и выдерживая его в лунках не менее 20 секунд. По окончании промывки тщательно удалить влагу из планшета, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

7. 2. Внесение контрольных образцов сывороток

В 6 лунок A1-F1 планшета внести по 80 мкл раствора № 2.

В три лунки A1-C1 внести по 20 мкл K⁺.

В три лунки D1-F1 внести по 20 мкл K⁻.

В две лунки G1 и H1 внести по 100 мкл раствора № 2 (контроль конъюгата);

7.3. В свободные лунки планшета внести испытуемые образцы:

7.3.1. При проведении исследований образцов сыворотки или плазмы крови внести по 80 мкл раствора № 2 в лунки планшета и добавить по 20 мкл предварительно подготовленных (см. п. 5.1.) испытуемых образцов, перемешивая содержимое лунок пипетированием или на встряхивателе.

7.3.2. При проведении исследований образцов ликвора внести по 50 мкл раствора № 2 в лунки планшета и добавить по 50 мкл предварительно подготовленных образцов ликвора.

Планшет накрыть чистой сухой крышкой или заклеить пленкой и выдержать в течение 30 минут при температуре 37±1 °С.

Полезно поместить каждый планшет в полиэтиленовый пакет. Это обеспечит одинаковую влажность и позволит избежать краевых эффектов.

7.4. Промывание

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет пятикратно раствором № 1 (см. п. 6.1.), внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалить влагу из планшета, постукивая им по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

ВНИМАНИЕ! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов.

7.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п. 6.2.). Планшет закрыть сухой крышкой или заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 30 мин при температуре 37±1°С.

7.6. Промывание. Повторите процедуры, описанные в п. 7.4.

7.7. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п. 6.3.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от 15°С до 25°С.

7.8. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводить при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения 620-650 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

8.1. Учет результатов исследования проводить при соблюдении следующих условий:

среднее значение ОП в лунках с отрицательным контролем ОП _{СРК⁻}	не выше 0,15
среднее значение ОП в лунках с положительным контролем ОП _{СРК⁺}	не ниже 0,80
среднее значение ОП контроля конъюгата	не выше 0,10

При получении иных показателей исследование повторить.

8.2. Рассчитать критическое значение ОП (ОП_{КРИТ}) по формуле:

$$ОП_{КРИТ} = ОП_{СРК^-} + A, \text{ где коэффициент } A = \underline{\hspace{2cm}}$$

Результат исследования образца считать:

положительным, если для исследуемого образца $ОП \geq ОП_{КРИТ}$.

отрицательным, если для исследуемого образца $ОП < ОП_{КРИТ}$.

Если ОП для исследуемого образца ниже ОП_{КРИТ}, но существенно превышает значения ОП для большинства отрицательных образцов, рекомендуется исследовать образец, повторно взятый у того же пациента через 7-10 дней. Оценку результатов следует проводить на основании сравнения исследования парных сывороток от одного пациента на одном рабочем планшете. Выявление сероконверсии свидетельствует о наличии сифилитической инфекции.

При получении сомнительного результата при исследовании парных сывороток рекомендуется тестировать эти образцы другими методами.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°С до 8°С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9°С до 30°С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемиологических учреждениях.

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.