

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГБУ «ГНЦДК»
Минздрава России

А.А. Кубанов
«12» *августа* 20*15* г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов

для качественного определения суммарных антител к возбудителю сифилиса
Treponema Pallidum в сыворотке, плазме крови и ликворе человека
методом иммуноферментного анализа
«ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела»

Оглавление

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ	4
Назначение	4
Область применения	4
Показания к применению	4
Побочные действия	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
Основные потребительские характеристики	4
Состав и комплектация набора	4
Принцип метода	5
3. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ..	6
5. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	7
7. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	8
Чувствительность	8
Специфичность	8
Воспроизводимость	8
Аналитическая специфичность	8
Диагностические характеристики	8
8. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ.....	9
9. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ	9
Подготовка реагентов	9
Проведение исследований	9
Критерии валидности для контрольных образцов	10
Анализ результатов	10
Интерпретация результатов	10
10. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕМОНТ	10
11. СРОК ГОДНОСТИ.....	11
12. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ	11
13. УСЛОВИЯ ОТПУСКА	11
14. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	11

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИФА	Иммуноферментный анализ
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ТУ	Технические условия
К+	Контрольный положительный образец
К-	Контрольный отрицательный образец
ПБ	Промывочный буферный раствор
ОП	Оптическая плотность
СПКО	Стандартная панель контрольных образцов

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для качественного определения суммарных антител к возбудителю сифилиса *Treponema Pallidum* в сыворотке, плазме крови и ликворе человека методом иммуноферментного анализа «ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: набор реагентов «ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела» или набор.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Назначение

Набор реагентов «ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела» предназначен для качественного определения всех классов иммуноглобулинов, специфичных в отношении основных иммунодоминантных антигенов бледной трепонемы (*T. pallidum*) – мембранных белков TrN15, TrN17, TrN47, TmpA – в сыворотке, плазме крови и ликворе человека методом иммуноферментного анализа с целью лабораторной диагностики сифилиса.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика.

Только для профессионального применения.

Показания к применению

Набор используется для лабораторной диагностики сифилиса; для скринингового исследования биологического материала от всех групп населения, в том числе от лиц с подозрением на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП).

Побочные действия

Не выявлены.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Основные потребительские характеристики

Набор является нестерильным медицинским изделием и рассчитан на проведение исследований 96 образцов, включая контрольные образцы. Возможно дробное использование набора (до 24 независимых постановки, используя 3 лунки для контрольных образцов).

Некоторые реагенты набора содержат материалы животного и человеческого происхождения, включая сыворотку (плазму) крови человека. Набор не содержит лекарственных средств и вредных веществ в опасных концентрациях.

Потенциальные потребители: для профессионального использования квалифицированным персоналом клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений с высшим и средним медицинским, биологическим образованием. Медицинское изделие применяется специалистами: врачи, в т.ч. врач клинической лабораторной диагностики, средний медицинский персонал, медицинский лабораторный техник.

Набор подходит для постановки анализа в том числе с использованием автоматических ИФА-анализаторов.

Состав и комплектация набора

Таблица 1

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Планшет 96-луночный, разборный, в лунках которого сорбированы антигены <i>T. pallidum</i>	1 шт.
Конъюгат	Антигены <i>T. pallidum</i> , меченные пероксидазой хрена, прозрачная или опалесцирующая от синего до сине-фиолетового цвета жидкость, содержит консервант РС300* (0,05%), фенол (0,05%)	1 фл. – 12 мл

Компонент	Описание	Количество
К+, контрольный положительный образец	Инактивированная сыворотка** крови человека, содержащая антитела к <i>T. pallidum</i> , опалесцирующая красного цвета жидкость, содержит консервант РС300* (0,05%)	1 фл. – 0,4 мл
К-, контрольный отрицательный образец	Инактивированная сыворотка** крови человека, не содержащая антитела к <i>T. pallidum</i> , опалесцирующая зеленого цвета жидкость, содержит консервант РС300* (0,05%)	1 фл. – 0,6 мл
Раствор ТМБ	Субстратный раствор хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидина), прозрачный бесцветный или слегка зеленоватый раствор. При хранении может приобретать желтоватый оттенок	1 фл. – 13 мл
Стоп-реагент	0,5 М раствор серной кислоты, прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. – 13 мл
25 x ПБ	25-кратный концентрат промывочного буферного раствора, прозрачная или опалесцирующая бесцветная или желтоватого цвета жидкость, допустимо образование осадка, растворяющегося при нагревании, содержит фосфатно-солевой буферный раствор с твином 20	1 фл. – 40 мл
Ванночки для жидких реагентов	Резервуары для реагентов объемом до 30 мл, используемые с многоканальными дозаторами	2 шт.
Наконечники для дозаторов	Наконечники для дозаторов 2-200 мкл	16 шт.
Клейкие плёнки для планшетов	Прозрачные клейкие пленки для заклеивания планшетов	2 шт.
Инструкция по применению	Брошюра А5	1 шт.

* - консервант РС300 является аналогом ProClin300.

** - сыворотки крови человека, входящие в состав контрольных образцов, не содержат HbAg, антител к ВИЧ 1 и 2, к ВГС.

Компоненты набора упакованы в коробку. В комплект поставки входит паспорт качества.

Принцип метода

Одностадийный «сэндвич» вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Рекомбинантные антигены, аналоги мембранных белков *T. pallidum*, иммобилизованы на поверхности лунок полистиролового планшета и они же, конъюгированные с пероксидазой хрена, входят в состав конъюгата и находятся в реакционной смеси в лунках планшета во время инкубации с образцом. Если антитела присутствуют в образце, то они связываются одним паратопом с антигеном на твердой фазе (в лунках иммуносорбента), а другим – с антигеном, меченным пероксидазой хрена (в конъюгате). Визуализация полученного комплекса происходит в цветной реакции пероксидазы с раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). После остановки реакции результаты регистрируются измерением оптической плотности в лунках планшета.

3. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 3.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.
- 3.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.
- 3.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала, указанных в разделе «Исследуемые образцы».
- 3.4. Набор предназначен для качественного определения наличия суммарных антител к бледной трепоне без дифференциации по классам.
- 3.5. Результаты исследований, полученные с помощью набора, не могут быть единственным основанием для постановки диагноза. В целях диагностики полученные результаты должны интерпретироваться в сочетании с данными других лабораторных исследований и клинического обследования.
- 3.6. Набор предназначен только для профессионального применения.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).
- 4.2. Сыворотки крови, входящие в состав контрольных образцов (К+ и К-), инактивированы прогреванием при 56°C в течение 1 часа и не содержат HBsAg, антител к ВИЧ 1,2 и вирусу гепатита С. Тем не менее, с контрольными образцами и с исследуемыми образцами следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом.
- 4.3. Реагенты набора и исследуемые образцы (инфицированные или потенциально инфицированные) относятся к медицинским отходам. Уничтожение не использованных наборов (с истекшим сроком годности, поврежденная упаковка и т.п.), а также остатков реагентов набора следует проводить в соответствии с действующими правилами обращения с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.3684-21).
- 4.4. Раствор ТМБ и стоп-реагент обладают раздражающим действием на кожу и слизистые, при попадании на кожу промыть большим количеством воды.
- 4.5. Все работы должны выполняться в халате и одноразовых перчатках.
- 4.6. Всё оборудование, лабораторные материалы и принадлежности, контактирующие с реагентами набора и исследуемыми образцами, должны быть обработаны дезинфицирующим раствором (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов).
- 4.7. В случае повреждения упаковки или тары при транспортировании или хранении компонентов набора, в результате которого разлились жидкости, следует обработать поверхности столов, оборудования и др. дезинфицирующим раствором.
- 4.8. Надежность результатов анализа зависит от выполнения следующих правил:

- строгое выполнение всех требований данной инструкции;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для каждого реагента нужно использовать отдельную емкость;
- отбирать из флаконов только необходимый для анализа объем реагентов, не допускается переливать обратно во флаконы остатки реагентов;
- каждый исследуемый образец, а также реагенты набора необходимо отбирать новым одноразовым наконечником;
- не использовать образцы, содержащие азид натрия;
- на этапе промывки рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер, недостаточно качественная промывка может повлиять на результаты анализа;
- не допускается подсыхание лунок иммуносорбента на всех этапах постановки ИФА;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты набора и рабочую поверхность;
- применяемое оборудование и дозаторы должны быть поверены и регулярно проходить калибровку;
- при внесении реагентов в лунки микропланшета необходимо осуществлять постоянный визуальный контроль уровня жидкости в лунках;
- при работе с набором в лаборатории температура окружающего воздуха должна быть от + 18 °С до + 25 °С.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Холодильник (температура 2-8 °С);
- Автоматический микропланшетный спектрофотометр (ридер) со светофильтрами 450 нм, 620-650 нм;
- Термостат или термощейкер для микропланшетов, поддерживающие температуру 37 °С ± 1 °С;
- Устройство для отмывки иммунологических планшетов автоматическое (вошер);
- Дозаторы одноканальные и многоканальные переменного объема на 10, 100 и 1000 мкл; валидированные и поверенные;
- Одноразовые наконечники для дозаторов и ванночки для реагентов;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Таймер (секундомер).

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- 6.1. Анализируемые образцы: сыворотка, плазма крови человека с ЭДТА или ликвор (спинномозговая жидкость).
- 6.2. Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой. По возможности как можно скорее отделить сыворотку/плазму центрифугированием.
- 6.3. Спинномозговую жидкость отбирать методом аспирации путем прокола поясничной субокципитальной области или мозговых желудочков пункционными иглами.

- 6.4. Образцы сыворотки/плазмы хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток или при температуре ниже минус 18 °С, если требуется более длительное хранение. Допускается однократная заморозка и разморозка образцов. После размораживания образцы необходимо тщательно перемешать.
- 6.5. Хранение образцов ликвора: при температуре (2-8) °С – 24 часа, при температуре от -24 до -16 °С – в течение 3 месяцев, при температуре не выше -68 °С – длительно. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.
- 6.6. Не использовать образцы с содержанием азидата натрия.
- 6.7. Во избежание ложных результатов не использовать образцы с выраженным гемолизом, повышенным содержанием липидов или бактериальным проростом.
- 6.8. Образцы, содержащие взвешенные частицы осветлить центрифугированием 10-15 минут при 2500-3000 об/мин.

7. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Чувствительность набора определяется по стандартной панели контрольных образцов (СПКО TP-Ab-total (+/-)), как процент образцов, интерпретируемых набором как положительные от общего числа положительных образцов, и составляет 100%.

Специфичность набора определяется по стандартной панели контрольных образцов (СПКО TP-Ab-total (+/-)), как процент образцов, интерпретируемых набором как отрицательные от общего числа отрицательных образцов, и составляет 100%.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации не превышает 8%.

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием образцов от пациентов с ВИЧ-1, вирусом гепатита С и вирусом гепатита В. Перекрестная реактивность не выявлена.

Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность набора была проверена на образцах сыворотки крови и образцах ликвора, содержащих антитела к *Treponema pallidum*, и составила 96,3% и 95% соответственно.

Диагностическая специфичность набора была проверена на образцах сыворотки крови и образцах ликвора, не содержащих антитела к *Treponema pallidum*, и составила 96% и 100% соответственно.

Была подтверждена диагностическая эквивалентность плазмы и сыворотки крови при исследовании 25 положительных и 25 отрицательных образцов по суммарным антителам к *Treponema pallidum*.

8. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Не выявлено влияния потенциально интерферирующих веществ, представленных в таблице 2, в указанной концентрации на эффективность анализа при использовании набора.

Таблица 2. Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора реагентов «ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела»

Интерферент	Концентрация	Результат контроля
Билирубин	До 300,0 мг/л	Влияние не выявлено
Гемоглобин	До 300,0 г/л	Влияние не выявлено
Триглицериды	До 10 г/л	Влияние не выявлено

9. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Подготовка реагентов

1. Все реагенты вынуть из коробки и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут.
2. Флаконы с жидкими реагентами осторожно перемешать, не допуская вспенивания.
3. Приготовить рабочий промывочный буферный раствор ПБ: флакон с 25хПБ перемешать, при наличии осадка прогреть до +40°C до полного растворения, затем охладить до комнатной температуры. В зависимости от используемого количества стрипов соответствующий объем концентрата развести водой очищенной в 25 раз. В таблице 3 приведен рассчитанный объем реагентов в зависимости от количества используемых стрипов. Готовый раствор допустимо хранить в течение 14 суток при 2-8 °С.

Таблица 3. Приготовление рабочего промывочного буферного раствора:

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25х ПБ, мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода, мл	До 75	До 175	До 250	До 325	До 425	До 500	До 575	До 675	До 750	До 825	До 925	До 1000

4. Вскрыть пакет с иммуносорбентом, вынуть рамку с необходимым количеством стрипов, оставшиеся стрипы убрать в фольгированный пакет с замком Zip-Lock и хранить в течение срока годности.
5. Реагенты готовые к применению: конъюгат, К+, К-, раствор ТМБ, стоп-реагент. Оставшиеся не использованными реагенты хранить во флаконах с плотно завинченными крышками в течение срока годности.

Проведение исследований

1. В лунки иммуносорбента внести по 90 мкл раствора конъюгата, используя ванночку для реагентов и наконечники для дозаторов, входящие в состав набора. При работе с

раствором конъюгата использовать только чистую посуду, нельзя допускать контакта раствора с металлическими предметами и ионами металлов.

2. В одну лунку внести 10 мкл K+, в две лунки по 10 мкл K- и в остальные лунки – по 10 мкл исследуемых образцов (сыворотки, плазмы или ликвора пациента), перемешивая осторожным пипетированием. При внесении образцов цвет раствора в лунках должен измениться с фиолетово-синего на светло-синий. Перемешать содержимое лунок, осторожно постукивая по рамке планшета или с помощью микропланшетного шейкера в течение 1 минуты при 600 об/мин.
3. Планшет закрыть пленкой и выдержать 60 минут в термостате при 37 ± 1 °С.
4. По истечении времени инкубации снять пленку и поместить её в ёмкость с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства удалить содержимое лунок в ёмкость с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 5 раз рабочим раствором ПБ. В процессе каждого цикла промывки вносить не менее 300 мкл раствора в каждую лунку, время между заполнением и аспирацией должно быть не менее 15 сек. По окончании промывки оставшуюся жидкость удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5. Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ, используя ванночку для реагентов и наконечники, входящие в состав набора. Нельзя допускать контакта раствора ТМБ с металлами и ионами металлов и длительного воздействия света.
6. Планшет выдержать при комнатной температуре в темноте 20 минут.
7. По истечении времени инкубации реакцию остановить добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента, перемешать содержимое лунок осторожным постукиванием по рамке планшета и убедиться, что синий цвет жидкости сменился на желтый. В течение 5 минут провести учет результатов спектрофотометрически при основной длине волны 450 нм и референтной – 620 нм.

Критерии валидности для контрольных образцов

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий: значения ОП в лунках с K+ не ниже 0,800; значения ОП в лунках с K- не выше 0,200.

Анализ результатов

Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности для лунок с K- (ОПк-). Рассчитать критическое значение оптической плотности ОПкр. по формуле:

$$\text{ОПкр.} = 0,200 + \text{ОПк-}$$

Интерпретация результатов

Образцы со значением ОП выше или равным ОПкр. считать положительными, образцы со значением ОП ниже ОПкр. считать отрицательными.

10. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕМОНТ

Набор реагентов «ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела» техническому обслуживанию и техническому ремонту не подлежит.

11. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора составляет 12 месяцев с даты изготовления, установлен по результатам ускоренной проверки стабильности. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

12. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение наборов должно осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от +2 до +8 °С в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры в течение всего срока годности.

Хранение реагентов после вскрытия предусмотрено при температуре +2 до +8 °С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности.

Транспортирование наборов – всеми видами крытого транспорта с соблюдением температурного режима – при температуре от +2 до +8 °С – в соответствии с правилами перевозок. Допускается транспортирование при температуре от +9 до +25°С не более 10 сут.

13. УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения и клиничко-диагностических лабораторий.

14. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

Срок годности набора – 1 год.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ГНЦДК – ИФА *T. pallidum* суммарные антитела», следует обращаться по адресу: ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, 107076, Москва, ул. Короленко, д.3, стр.6, тел. 84997852015, info@cnikvi.ru.

При выявлении побочных действий, нежелательных реакций, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Символы, используемые в документации производителя

№	Символ	Наименование
1		Изготовитель (наименование предприятия-изготовителя, адрес, телефон, электронная почта)
2		Номер по каталогу
3		Код партии
4		Дата изготовления
5		Использовать до
6		Условия транспортировки и хранения (температурный диапазон)
8		Указывает совокупное количество (n) тестов <i>in vitro</i> , которые могут быть выполнены с этим изделием
9		Не использовать при повреждении упаковки и обратиться к инструкции по применению
10		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
11		Обратитесь к инструкции по применению
12		«Осторожно». Указывает на необходимость соблюдения мер предосторожности при обращении с изделием
13		«Верх»
14		Хрупкое, обращаться осторожно
15		Не допускать воздействия солнечного света
16		Не допускать воздействия влаги

Литература

1. Silva AA, de Oliveira UD, Vasconcelos LD, Foti L, Leony LM, Daltro RT, Leitolis A, Lima FW, Krieger MA, Zanchin NI, Santos FL. Performance of *Treponema pallidum* recombinant proteins in the serological diagnosis of syphilis. Plos one. 2020 Jun 18;15(6):e0234043. Doi:/10.1371/journal.pone.0234043
2. Министерство здравоохранения Российской Федерации, Российское общество дерматовенерологов и косметологов. Клинические рекомендации «Сифилис». 2020
3. СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 3" М: 2022.