

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного выявления специфических суммарных антител к *Treponema pallidum* в ликворе, сыворотке (плазме) крови «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА»

1. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

1.1. Описания назначения:

а) Набор реагентов для иммуноферментного выявления специфических суммарных антител к *Treponema pallidum* в ликворе, сыворотке (плазме) крови «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» предназначен для качественного выявления специфических суммарных антител (IgG, IgA, IgM) к *Treponema pallidum* в ликворе (СМЖ) и сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

б) Функциональное назначение.

Применяется в лабораторной диагностике сифилиса для серологических и скрининговых исследований крови всех групп населения.

в) Сифилис – широко распространенное инфекционное заболевание, возбудителем которого является грамотрицательная спирохета *Treponema pallidum*. Болезнь характеризуется повреждениями кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей и нервной системы. Это системная инфекция, при которой периоды активных проявлений болезни чередуются со скрытыми периодами. Первичными маркерами специфического иммунного ответа инфицирования *Treponema pallidum* являются специфические антитела класса М (IgM), которые регистрируются со второй недели после инвазии и достигают наивысшего уровня в крови на 6–9 неделе. На четвертой неделе после заражения организм начинает вырабатывать специфические антитела класса G (IgG) (период первичного серопозитивного сифилиса). После успешно проведенного лечения количества (титр) IgG антител в крови постепенно снижается, но у некоторых лиц, переболевших сифилисом, иммуноглобулины этого класса могут сохраняться длительное время и определяться чувствительными серологическими методами.

г) В качестве анализируемого образца используется ликвор, сыворотка, плазма с цитратом натрия, ЭДТА или гепарином.

д) Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.2. Набор предназначен для диагностики *ин vitro*.

1.3. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. **Принцип работы Набора.** Выявление специфических суммарных антител (IgG, IgA, IgM) к *Treponema pallidum* основано на использовании твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы рекомбинантные антигены *Treponema pallidum*. Антитела из образца связываются с антигенами на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата – рекомбинантных антигенов с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «комплекс, содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию специфических суммарных антител (IgG, IgA, IgM) к *Treponema pallidum*. Регистрация результатов реакции производится измерением оптической плотности содержимого лунки планшета на фотометре микропланшетном с использованием комбинации: основной фильтр 450 нм и референс светофильтр 620-680 нм.

2.2. Набор реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» выпускается в 3 вариантах комплектации:

Комплект 1 рассчитан на 96 определений, включая контроли.

Комплект 2 рассчитан на 192 определения, включая контроли.

Комплект 3 рассчитан на 480 определений, включая контроли.

2.2.1. КОМПЕКТНОСТЬ:

Состав	Описание	Количество (объем)		
		Комплекта-ция 1	Комплекта-ция 2	Комплекта-ция 3
Планшет 96-луночный	полистироловый, стрипированный, на внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы рекомбинантные антигены <i>Treponema pallidum</i> , готов к использованию	1 шт	2 шт	5 шт
Отрицательная контрольная сыворотка	инактивирована, на основе пула сыворотки крови человека, не содержащей специфических антител к <i>Treponema pallidum</i> , прозрачная бесцветная жидкость, готова к использованию	1 шт. (1.0 мл)	1 шт. (1.0 мл)	1 шт. (5.0 мл)
Положительная контрольная сыворотка	инактивирована, на основе пула сыворотки крови человека с высоким содержанием специфических антител к <i>Treponema pallidum</i> , прозрачная окрашенная жидкость (цвет компонента указан в аналитическом паспорте), готова к использованию	1 шт. (0.7 мл)	1 шт. (0.7 мл)	1 шт. (2.0 мл)
Концентрат конъюгата	прозрачная окрашенная жидкость (цвет компонента указан в аналитическом паспорте), 11-кратный концентрат	1 шт. (1.2 мл)	1 шт. (2.4 мл)	1 шт. (6.0 мл)
Буфер для разведения концентрата конъюгата	прозрачная окрашенная жидкость (цвет компонента указан в аналитическом паспорте), готов к использованию	1 шт. (12 мл)	1 шт. (30 мл)	2 шт. (30 мл)
Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ)	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 шт. (14 мл)	1 шт. (30 мл)	2 шт. (30 мл)
Концентрат отмывочного раствора	прозрачная бесцветная жидкость, 26-кратный концентрат	1 шт. (22 мл)	1 шт. (50 мл)	1 шт. (100 мл) или 2 шт. (50 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 шт. (14 мл)	1 шт. (30 мл)	2 шт. (30 мл)
Бумага для заклеивания планшета		2 шт	4 шт	10 шт
Инструкция по применению		1 шт	1 шт	1 шт
Паспорт контроля качества (аналитический паспорт)		1 шт	1 шт	1 шт

2.2.2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ НА МАРКИРОВКЕ:

Наименование компонента	Код компонента	Символ	Обозначения количества		
			Комплектация 1	Комплектация 2	Комплектация 3
Планшет 96-луночный	P111Z	SORB MTP	1 шт	2 шт	5 шт
Отрицательная контрольная сыворотка	CN111Z	CONTROL -	1 шт x 1.0 мл	1 шт x 1.0 мл	1 шт x 5.0 мл
Положительная контрольная сыворотка	CP111Z	CONTROL +	1 шт x 0.7 мл	1 шт x 0.7 мл	1 шт x 2.0 мл
Концентрат конъюгата	T111XZ	CONJ 11X	1 шт x 1.2 мл	1 шт x 2.4 мл	1 шт x 6.0 мл
Буфер для разведения концентрата конъюгата	ST111Z	DIL CONJ	1 шт x 12 мл	1 шт x 30 мл	2 шт x 30 мл
Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ)	R055Z	SUBS TMB	1 шт x 14 мл	1 шт x 30 мл	2 шт x 30 мл
Концентрат отмывочного раствора	S008Z	BUF WASH 26X	1 шт x 22 мл	1 шт x 50 мл	1 шт x 100 мл или 2 шт x 50 мл
Стоп-реагент	R050Z	STOP	1 шт x 14 мл	1 шт x 30 мл	2 шт x 30 мл
Бумага для заклеивания планшета	N003	-	2 шт	4 шт	10 шт
Инструкция по применению	K1111IR	-	1 шт	1 шт	1 шт
Паспорт контроля качества (аналитический паспорт)	K1111Q	-	1 шт	1 шт	1 шт

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения). Минимальная достоверно определяемая Набором «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» концентрация суммарных антител к *Treponema pallidum* в ликворе (СМЖ) и сыворотке (плазме) крови - 0,8 мМЕ/мл. Предел обнаружения IgG и IgM антител к *Treponema pallidum*, определяли с помощью контрольного образца производителя ООО «ХЕМА» аттестованного относительно международного стандарт ВОЗ 1-й - для IgG сифилитической плазмы человека и IgM (WHO International Standard 1st IS for human syphilitic plasma IgG and IgM, NIBSC code: 05/132). Минимальная достоверно определяемая Набором «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» концентрация IgG и IgM антител к *Treponema pallidum* в ликворе (СМЖ) и сыворотке (плазме) крови - 0,8 мМЕ/мл. В связи с отсутствием эталонных образцов и наборов для количественного измерения IgA антител к *Treponema pallidum*, предел обнаружения IgA антител к *Treponema pallidum* определяли с помощью двукратного разведения контрольного образца производителя «КО IgA *Treponema pallidum*». Набор реагентов определяет исследуемое разведение контрольного образца как положительное.

3.2. Аналитическая специфичность. Ликвор (СМЖ) и сыворотка (плазма) крови от пациентов с различными инфекциями были протестированы с помощью Набора «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА». Ни одна из испытанных проб не показала наличие перекрёстной реактивности.

Аналит	Перекрестная реакция
Антитела к вирусу гепатита А	отсутствует
Антитела к вирусу гепатита С	отсутствует
Антитела к вирусу гепатита В	отсутствует
Антитела к HTLV	отсутствует
Антитела к цитомегаловирус	отсутствует
Антитела к ВИЧ 1,2 и антигену р24 ВИЧ-1	отсутствует
Высокое содержание ревматоидного фактора	отсутствует

3.3. Воспроизводимость. Внутрисерийный коэффициент вариации результатов выявления суммарных антител к *Treponema pallidum* в одном и том же образце ликвора (СМЖ), сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» не превышает 6,0%.

Межсерийный коэффициент вариации результатов выявления суммарных антител к *Treponema pallidum* в одном и том же образце ликвора (СМЖ), сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» не превышает 7,0%.

3.4. Специфичность по стандартной панели предприятия. При проверке на панели предприятия, состоящей из образцов, достоверно содержащих антитела к *Treponema pallidum*, специфичность Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» составляет 100%.

3.5. Чувствительность по стандартной панели предприятия. При проверке на панели предприятия, состоящей из образцов, достоверно содержащих антитела к *Treponema pallidum*, чувствительность Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» составляет 100%.

3.6. Интерференция. На результаты анализа не оказывало влияния использование антикоагулянтов ЭДТА, гепарина и цитрата натрия, а также присутствие в образцах сыворотки (плазмы) крови: гемоглобина (<200 г/л), триглицеридов (<250 мг/дл), холестерина (<220 мг/дл), билирубина (<15 мг/дл), общего белка (<90 г/л); в ликворе: хлоридов (<140 ммоль/л), эритроцитов (<30*10⁶/л), глюкозы (<3,9 ммоль/л), белка (<12 г/л), лейкоцитов (<12 г/л), цитоза (<700 кл/мкл).

3.7. Клиническая проверка. Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 115 положительных образцах сывороток от 115 пациентов с выявленными специфическими суммарными антителами к *Treponema pallidum*, показали 100% чувствительность (115/115 интервал 99,7-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах плазмы с ЭДТА от 75 пациентов с выявленными специфическими суммарными антителами к *Treponema pallidum*, показали 100% чувствительность (75/75 интервал 99,7-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах плазмы с цитратом натрия от 75 пациентов с выявленными специфическими суммарными антителами к *Treponema pallidum*, показали 100% чувствительность (75/75 интервал 99,7-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах плазмы с гепарином от 75 пациентов с выявленными специфическими суммарными антителами к *Treponema pallidum*, показали 100% чувствительность (75/75 интервал 99,7-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 45 положительных образцах ликвора от 45 пациентов с выявленными специфическими суммарными антителами к *Treponema pallidum*, показали 100% чувствительность (45/45 интервал 99,8-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 215 отрицательных образцах сывороток от 215 условно здоровых пациентов и пациентов с выявленными острыми инфекционными процессами, не относящимися к определяемой группе, показали 100% специфичность (215/215 интервал 99,8-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 215 отрицательных образцах плазмы с ЭДТА от 215 условно здоровых пациентов и пациентов с выявленными острыми инфекционными процессами, не относящимися к определяемой группе, показали 100% специфичность (215/215 интервал 99,8-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 215 отрицательных образцах плазмы с цитратом натрия от 215 условно здоровых пациентов и пациентов с выявленными острыми инфекционными процессами, не относящимися к определяемой группе, показали 100% специфичность

(215/215 интервал 99.8-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 215 отрицательных образцах плазмы с гепарином от 215 условно здоровых пациентов и пациентов с выявленными острыми инфекционными процессами, не относящимися к определяемой группе, показали 100% специфичность (215/215 интервал 99.8-100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 40 отрицательных образцах ликвора (СМЖ) от 40 условно здоровых пациентов показали 100% специфичность (40/40 интервал 99.9-100%, с доверительной вероятностью 95%).

4. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2б.

4.2. Для использования в диагностике *in vitro*.

4.3. Сыворотки крови человека, входящие в состав набора (положительная контрольная сыворотка и отрицательная контрольная сыворотка), инактивированы и не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ 1, 2 и антигена р24 ВИЧ-1, антиген вируса гепатита В (HbSAg).

4.4. Все компоненты Набора являются нетоксичными.

4.5. Внимание! Использовать строго согласно Инструкции по применению. Не принимать внутрь!

4.6. Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарнопротивоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.7. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории, отвечающей требованиям Правила № 2455-81 «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения». Постановление главного санитарного врача от 28 января 2021 г. N4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиНом 3.3686-21 «санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». При работе с Набором требуется соблюдать «Инструкцию по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 года; ГОСТ Р 52905 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.8. Лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы, а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое. Лабораторное оборудование и принадлежности, которые используются при работе с Набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.9. Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических или механических дозаторов с фильтром. Одноразовые пластиковые материалы (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор с последующей утилизацией (см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

4.11. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70% раствором этилового спирта.

4.12. Не использовать по истечении срока годности. Не использовать, если упаковка повреждена. Перед применением убедиться в целостности компонентов Набора.

4.13. На результаты анализа с использованием Набора реагентов могут влиять такие факторы как неточность выполнения анализа или отступление от инструкции.

4.14. Набор реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» не содержит лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

4.15. При использовании согласно инструкции по применению изделие является безопасным (не несет физических, экологических и иных рисков).

4.16. Показания к применению медицинского изделия: применять в соответствии с назначением.

4.17. Противопоказания к применению медицинского изделия: противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет. Не применять не по назначению.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- фотометр микропланшетный, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм и референс светофильтре 620–680 нм. с настройкой «по воздуху»;
- термостат, поддерживающий температуру +37°C ± 3°C;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная;
- автоматический ИФА-анализатор открытого типа (при необходимости).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

В качестве анализируемого образца используется сыворотка (плазма) крови и ликвор (СМЖ).

6.1. Процедура получения анализируемого материала.

6.1.1. Сбор образцов крови следует проводить в соответствии с текущей практикой методом венепункции, соблюдая стандартные лабораторные процедуры. Для анализа использовать неразведённую сыворотку (плазму) крови.

6.1.2. Сбор образцов ликвора проводить в соответствии с методикой сбора образца.

6.1.3. Выбор пробирок для получения сыворотки крови и ликвора, подготовку биологических жидкостей, центрифугирование, хранение и транспортировку образца производить согласно правилам проведения преаналитического этапа, утвержденным для лаборатории.

6.2. Приготовление сыворотки крови пациентов.

6.2.1. Кровь отобрать венепункцией в одноразовую вакуумную или многоразовую стерильную с плотно закрывающейся крышкой пробирку для получения сыворотки (согласно правилам ОРГ преаналитического этапа и МУ лабораторий), охладить при комнатной температуре в течение 30 минут, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Центрифугировать 10 минут при оборотах 1500–2000 в минуту.

6.2.2. Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить сыворотку от сгустка.

6.2.3. Образцы с гемолизом, гиперлипидемией или очевидным бактериальным проростом исследованию не подлежат, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.3. Приготовление плазмы крови пациентов.

6.3.1. Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов. Выбор пробирок для получения плазмы, подготовку, центрифугирование, хранение и транспортировку образца производить согласно правилам проведения преаналитического этапа, утвержденным для лаборатории. Рекомендуемое соотношение антикоагулянта и биоматериала, а также способы подготовки образца и режимы центрифугирования описаны в инструкции по применению пробирок, используемых лабораторией.

6.3.2. В качестве антикоагулянтов использовать ЭДТА, гепарин и цитрат натрия.

6.4. Приготовление анализируемых образцов ликвора (СМЖ).

6.4.1. СМЖ отобрать методом люмбальной пункции.

6.4.2. Для исследования СМЖ собирают в стерильную пробирку без консервантов с соблюдением правил асептики. Спиналномозговую жидкость в количестве не менее 1,0 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1.5 или 2.0 мл. Предварительная обработка проб не требуется.

6.5. Если анализ проводится не в день взятия, закрытую пробирку с образцом следует хранить при температуре +2...+8°C в течение 5 суток или при температуре -20°C не более 2 месяцев. Вскрытая пробирка хранится при температуре +2...8°C в течение 48 часов. Допускается лишь однократное замораживание/оттаивание материала.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы ликвор (СМЖ), сыворотки (плазмы) крови, следует выдержать при комнатной температуре +18-25°C не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета. Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета.

7.3. Приготовление отмывочного раствора. Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

7.4. Приготовление конъюгата. Приготовить конъюгат: для этого разбавить концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. **ВНИМАНИЕ!** Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: на 1 стрип (8 лунок) требуется 990 мкл конъюгата: 90 мкл концентрата конъюгата + 900 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата.

7.5. Таблица расхода реагентов:

Количество стрипов	Отмывочный раствор (BUF WASH)		КОНЬЮГАТ (CONJ)	
	BUF WASH 26X, мл	Вода дистиллированная, мл	CONJ 11X, мл	DIL CONJ, мл
1	1.5	37.5	0.09	0.9
2	3.0	75	0.18	1.8
3	4.5	112.5	0.27	2.7
4	6.0	150	0.36	3.6
5	7.5	187.5	0.45	4.5
6	9.0	225	0.54	5.4
7	10.5	262.5	0.63	6.3
8	12	300	0.72	7.2
9	13.5	337.5	0.81	8.1
10	15	375	0.90	9.0
11	16.5	412.5	0.99	9.9
12 (целый планшет)	18	450	1.08	10.8

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Ручная постановка.

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов: 4 лунки для контрольных сывороток (3 лунки для отрицательной контрольной сыворотки и 1 лунка для положительной контрольной сыворотки), лунки для анализа исследуемых образцов.
2	Внесите во все лунки по 90 мкл раствора конъюгата. Внесение раствора конъюгата в лунки планшета необходимо произвести в течение 5 минут.
3	Внесите в соответствующие лунки по 10 мкл положительной контрольной сыворотки и по 10 мкл отрицательной контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови и ликвора (СМЖ). Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5 минут.
4	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки планшета 5 раз. При каждой отмывке добавляйте во все лунки не менее 300 мкл отмывочного раствора, встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при температуре +18...+25°C в течение 15-20 минут.
7	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
8	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре микропланшетном при длине волны 450 нм и референс светофильтре 620–680 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 минут после внесения стоп-реагента. Допускается измерение ОП содержимого лунок планшета не позднее 4 часов при хранении планшета при температуре +2...+8°C. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

8.2. Автоматическая постановка.

Постановку на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа провести в соответствии с процедурой, описанной в п.8.1 и руководством пользования анализатора.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.

9.1. Результаты анализа считать достоверными, если:

- ОП отрицательной контрольной сыворотки не выше 0.15 оптических единиц (ОЕ);
- ОП положительной контрольной сыворотки не ниже 0.9 оптических единиц (ОЕ).

9.2. Рассчитайте среднее значение ОП отрицательной контрольной сыворотки.

$$\text{ОП (CONTROL -)} = \{ \text{ОП (CONTROL -)1} + \text{ОП (CONTROL -)2} + \text{ОП (CONTROL -)3} \} / 3$$

9.3. Определите граничное значение оптической плотности (ОП_{крит} или Cut off). Для этого к среднему значению ОП отрицательной контрольной сыворотки прибавьте коэффициент А.

$$\text{Cut off} = \text{ОП (CONTROL -)} \times \text{Ср} + \text{А}$$

9.4. Рассчитайте границы «серой зоны» (СЗ) – значения ОП, которые находятся в пределах 10.0% ниже граничного значения Cut off.

$$\text{Cut off} \times 0.9 \leq \text{СЗ} \leq \text{Cut off}$$

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При ОП образца < СЗ – образец отрицательный.

При ОП образца > Cut off – образец положительный,

Исследуемые образцы в пределах СЗ считать неопределенными. Такие образцы следует исследовать повторно через 1-2 недели.

10.1. Полуколичественный учет результатов.

Разбавить образец в 10 раз отмывочным раствором, для этого добавить 50 мкл образца в 450 мкл отмывочного раствора. Провести последовательное титрование с шагом кратным двум.

Пример:

Разведение	Объем образца (разведение), мкл	Объем отмывочного раствора, мкл
1:10	50 (без разведения)	450
1:20	100 (1:10)	100
1:40	100 (1:20)	100
1:80	100 (1:40)	100
1:160	100 (1:80)	100
1:320	100 (1:160)	100
1:640	100 (1:320)	100
1:1280	100 (1:640)	100

Титром считать разведение, при котором образец будет отрицательным (ОП разведенного образца < Cut off). Если при разведении 1:1280 образец остается положительным, то титр считать, как "> 1280" или провести титрование дальше до получения отрицательного значения.

10.2. Определение титра с помощью индекса позитивности (ИП).

Развести положительный образец в 100 раз, используя отмывочный буфер. Провести ИФА, как описано выше. Вычислить ИП для разведенных исследуемых образцов по формуле:

$$\text{ИП} = \text{ОПиссл} (1:100) / \text{Cut off}$$

где: ОПиссл (1:100) – оптическая плотность положительных исследуемых образцов, разведенных в 100 раз.

Полученные значения ИП использовать для определения титра по таблице:

Значение ИП	0.30-0.65	0.66-1.40	1.41-2.00	2.1-4.7	4.8-8.5	8.6-10.6	10.7-11.8	выше 11.8
Титр образца	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	выше 1:2560

11. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

11.1. Набор реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста.

11.2. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) этого изделия.

12.1. Транспортирование.

12.1.1. Транспортирование Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре +2...+8 °С. Допускается транспортировка Набора при температуре до +25°С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

12.1.2. Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения «Холодовой цепи», обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

12.1.3. Изделия, транспортируемые с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

12.2. Хранение. Хранение изделий и/или компонентов при температуре от +2...+8 °С должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение светочувствительных изделий и/или компонентов должно осуществляться в темном месте.

12.2.1. Набор реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора. Допускается хранение Набора при температуре до +25°С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого Набора.

12.2.2. В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- контрольные образцы после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8°С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- концентрат конъюгата, буфер для разведения концентрата конъюгата, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

12.2.3. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

12.2.4. Срок годности Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» – 24 месяца.

12.3. Эксплуатация. Все варианты комплектаций набора предназначены для ручной постановки (фотометр микропланшетный, вертикального сканирования, при длине волны 450 нм) и для постановки на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа (например: «Lazurite» (Dyupex, США), «Alisei Q.S.» (Radim, Италия), «Еволис» («БИО-РАД» Франция) с возможностью, как дробного использования планшета (набора), так и для постановки целого планшета (набора). Общее количество повторов определяется квалификацией персонала и рекомендациями GLP.

Рекомендуется постановка исследуемых образцов в дубликатах. Разрешается проведение анализа в монопликатах. Производитель гарантирует сохранение всех технических характеристик Набора и достоверность результатов.

Потенциальный потребитель – врачи клинико-диагностических лабораторий. Профессиональная квалификационная группа «Врачи и провизоры» всех уровней (Приказ №526 от 06.08.2007 г «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»). Медицинский персонал клинико-диагностических лабораторий должен иметь документированное подтверждение проведенного обучения, связанного с потенциальным риском, сочетающимся с работой, с лбым медицинским (клиническим) лабораторным устройством.

12.3.1. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- не использовать Набор после окончания срока годности;
- не использовать Набор реагентов, если упаковка повреждена;
- не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат отмывочного раствора, стоп-реагент, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ));
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой;
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку;
- исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования;
- не допускать присутствия паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении иммуноферментного анализа;
- после использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

12.3.2. Не допускается использование положительной контрольной сыворотки, если раствор во флаконе мутный, наблюдается осадок или неприятный запах.

12.3.3. Все компоненты Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

12.3.4. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры проведения анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

12.3.5. Не использовать компоненты из других Наборов.

12.3.6. Изделия и/или компоненты Набора реагентов «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» ремонту и техническому обслуживанию не подлежат.

12.4. Утилизация.

12.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

12.4.2. Медицинские отходы класса А, Б. Утилизацию или уничтожение наборов реагентов следует проводить в соответствии с 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», СанПин 2.1.7.2527-09 (2.1.7.728-99) «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

12.4.3. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

Предприятие-изготовитель гарантирует стабильность компонентов и Набора «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА», а также соответствие Набора «СИФИЛИС СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА-ИФА» требованиям Технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.