

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный  
санитарный врач  
Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

«02»

2010 г.

№

01-11/109-10

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
“ЛЮИС-ТЕСТ”

для определения ассоциированных с сифилисом реактивных антител  
Комплект 2

## Содержание

I. Назначение.....	3
II. Общая информация.....	3
III. Принцип теста.....	3
IV. Состав набора “ЛЮИС-ТЕСТ”.....	3
V. Меры предосторожности .....	4
VI. Инструкции по безопасности .....	4
VII. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов .....	5
VIII. Отбор и подготовка образцов.....	5
IX. Подготовка реагентов.....	5
X. Контроль кардиолипидного антигена .....	5
XI. Учет результатов исследования.....	6
XII. Анализ исследуемых образцов.....	6
XIII. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	7
XIV. Объяснение символов.....	8

**Набор реагентов выпускается в двух комплектах:**

Комплект 2 - рассчитан на проведение 500 определений на тест-картах в реакции микропреципитации ассоциированных с сифилисом реактивных антител, включая исследование контрольных образцов.

**I. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов «ЛЮИС-ТЕСТ» - предназначен для выявления ассоциированных с сифилисом реактивных антител в сыворотке (плазме) крови человека как скрининговый тест при диагностике сифилиса, а так же при контроле эффективности лечения.

**II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

У больных активными формами сифилитической инфекции в сыворотке (плазме) крови появляются реактивные антитела, специфически взаимодействующие с липоидными антигенами клеточной мембраны возбудителя заболевания, *T.pallidum*. К регламентированным методам исследования, применяемым для диагностики сифилитической инфекции, относятся нетрепонемные тесты, предназначенные для определения реактивных антител с использованием кардиолипинового антигена: реакция микропреципитации (РМП), тест быстрого определения реактивов плазмы (Rapid Plasma Reagin Test, RPR) и другие.

Кардиолипиновый антиген, входящий в состав набора реагентов «ЛЮИС-ТЕСТ», содержит кардиолипин, лецитин, холестерин, холин-хлорид, ЭДТА и тимеросал в качестве консерванта.

После успешно проведенной специфической терапии с применением антибактериальных средств у пациентов с сифилитической инфекцией наблюдается снижение содержания реактивных антител к *T. pallidum*, и обычно через несколько месяцев результаты реактивных тестов становятся отрицательными. Результаты полуколичественного определения реактивных антител (титра антител) могут быть использованы в качестве критериев оценки эффективности антибиотикотерапии больных сифилисом, излеченности и возможности снятия с клинико-диагностического наблюдения.

**III. ПРИНЦИП ТЕСТА**

При проведении реакции микропреципитации кардиолипиновый антиген взаимодействует с присутствующими в сыворотке (плазме) крови больных сифилисом реактивными антителами с образованием визуально определяемых темных частиц (агрегатов). Определение проводят в реакции микропреципитации на тест-картах.

**IV. СОСТАВ НАБОРА «ЛЮИС-ТЕСТ»**

Таблица 1

Реагент	Форма выпуска
	комплект 2
КА (кардиолипиновый антиген) – суспензия, содержащая кардиолипин в концентрации 0,033%, лецитин в концентрации 0,27%, холестерин в концентрации 0,9%, с добавлением холин-хлорида в конечной концентрации 10%, ЭДТА - стабилизатора в конечной концентрации 0,0125 моль/л и тимеросала - консерванта в конечной концентрации 0,1%, краситель судан черный. После тщательного перемешивания осторожным опрокидыванием флакона КА представляет собой суспензию темного сине-серого цвета, при отстаивании разделяется на опалесцирующую бесцветную или голубоватую жидкость с осадком темного сине-серого цвета.	2 флакона по 5,0 мл
К+ (положительный контрольный образец), инактивированный, жидкий - сыворотка крови человека, содержащая реактивные антитела к антигенам <i>T.pallidum</i> , не содержащая антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С человека, а также р24 ВИЧ и HBsAg; инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	1 флакон 1,0 мл

Реагенты помещены в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вложена инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть укомплектован пластмассовыми пипетками (капельницами) для дозирования КА.

## V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий и смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого исследуемого образца.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения исследования.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время хранения.
- Нельзя использовать пластиковые флаконы для хранения КА в связи с сорбцией антигена на стенках флакона.
- После использования пипетки тщательно промыть водой дистиллированной и высушить.
- Во время работы не прикасаться к контрольным поверхностям тест-карты, поскольку жировые пятна могут повлиять на результаты исследования. При распределении образца по поверхности круга не касаться наконечником (пипеткой) поверхности круга. Не допускать высыхания жидкости на поверхности круга!

## VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики "in vitro".
- Образцы сыворотки (плазмы) крови человека, использованные при приготовлении положительного контрольного образца (К+), не содержат поверхностного антигена вируса гепатита В человека (HBsAg), р24 ВИЧ и антител к вирусам гепатита С человека и к ВИЧ-1,2.
- При работе с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один используемый метод тестирования не может гарантировать отсутствие в них инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами. Инструменты и рабочие поверхности оборудования до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% раствором этилового спирта.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами использовать специальную одежду и одноразовые перчатки, тщательно мыть руки после работы.
- Избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность разрешенными к применению дезинфицирующими растворами, например, 3 % раствором хлорамина Б.
- После проведения исследования твердые отходы (использованные тест-карты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены: путем погружения в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства или в 3% раствор хлорамина Б при длительности дезактивации не менее 1 часа (допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфекционного средства в соответствии с инструкцией по его использованию) или автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128°C под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа).
- Жидкие отходы (разведения сыворотки/плазмы крови, промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 часов) или кипячением в течение 30 минут или автоклавированием в течение 1 часа под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128°C.

## **VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ**

- Вода дистиллированная.
- Автоматические пипетки переменного объема (одно- или многоканальные).
- Одноразовые наконечники к пипеточным дозаторам.
- Шейкер с частотой колебаний 200 об/мин или ротатор с частотой колебаний 100±50 об/мин.
- Колба мерная объемом 100 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.
- Натрий хлористый в порошке или таблетках.

## **VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Сыворотку (плазму) крови получать стандартными методами. Для исследования можно использовать как прогретые в течение 30 мин при температуре 56 °С, так и непрогретые образцы сыворотки крови. Образцы сыворотки, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием. Для получения плазмы в качестве антикоагулянтов используют ЭДТА, или гепарин, или цитрат натрия.

Образцы сыворотки крови с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным ростом анализу не подлежат. Образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 дней; допустимо их длительное хранение в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С и ниже. Нельзя использовать образцы, замороженные и размороженные более 1 раза.

## **IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.

### **1. Растворы, требующие предварительной подготовки:**

**Раствор натрия хлорида 0,9% изотонический.** Навеску 0,9 г натрия хлорида внести в мерную колбу с 99,10 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения соли, профильтровать. Использовать для контроля КА и разведения К<sup>+</sup> и исследуемых образцов при определении титра реагиновых антител.

**Положительный контрольный образец (К<sup>+</sup>)** - перед проведением исследования выдержать 20-30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

**Кардиолипидный антиген (КА)** - перед использованием перемешать, осторожно опрокидывая флакон не менее 30 раз до получения гомогенной суспензии. Необходимое для исследования количество КА отобрать в чистый стеклянный флакон и выдержать 20-30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

При использовании капельницы – резервуар капельницы сжать, иглу опустить в стеклянный флакон с доведенным до гомогенного состояния кардиолипидным антигеном (осторожным перемешиванием) и набрать необходимое количество его в капельницу. По окончании заполнения капельницы флакон с кардиолипидным антигеном необходимо закрыть!

### **2. Хранение неиспользованных реагентов**

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора «ЛЮИС-ТЕСТ»: положительный контрольный образец (К<sup>+</sup>), кардиолипидный антиген (КА) хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

## **X. КОНТРОЛЬ КАРДИОЛИПИДНОГО АНТИГЕНА**

Контроль кардиолипидного антигена с положительным контрольным образцом К<sup>+</sup> и с раствором натрия хлорида 0,9% изотоническим должен проводиться каждый раз в день тестирования.

а) На поверхность одного из кругов тест-карты дозатором пипеточным нанести 50 мкл К<sup>+</sup> и равномерно распределить его наконечником дозатора по поверхности круга, после чего наконечник

сбросить в ёмкость для дезинфекции. На поверхность другого круга нанести 50 мкл раствора натрия хлорида 0,9% изотонического, который также распределить по всей поверхности круга.

б) На поверхность кругов тест-карты с нанесенными К+ и раствором натрия хлорида 0,9% изотонического пипеточным дозатором добавить по 16 мкл гомогенной суспензии кардиолипинового антигена (при использовании капельницы из состава набора реагентов – по 1 капле).

Если при работе используется капельница, то перед исследованием антиген в капельнице осторожно перемешать, капельницу перевести в вертикальное положение иглой вниз, первую каплю сбросить, проверяя тем самым проходимость иглы, а следующие капли нанести на поверхности кругов (не касаясь кончиком иглы поверхности круга!).

Реакционную среду перемешать осторожным покачиванием тест-карты на шейкере с частотой колебаний 200 об/мин в течение 8-10 мин или на ротаторе с частотой колебаний  $100\pm 50$  об/мин в течение 8 мин, после чего немедленно провести учет результатов.

## **XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Учёт результатов провести визуально в условиях достаточного освещения. На поверхности круга тест-карты с К+ должны быть видны крупные тёмные агрегаты (хлопья) частиц с четкими просветлениями жидкости между ними, результат исследования оценивается как положительный (реакция ++++). В круге с раствором натрия хлорида 0,9% изотонического, в котором реакционная среда должна оставаться без агрегатов и просветлений, с равномерно распределенными в ней частицами.

## **XII. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ**

### **1. Определение присутствия реакиновых антител (качественный анализ).**

На поверхность одного из кругов тест-карты дозатором пипеточным нанести 50 мкл образца и равномерно распределить его наконечником дозатора по всей поверхности круга, после чего наконечник сбросить в ёмкость для дезинфекции.

На поверхность круга тест-карты к исследуемому образцу добавить дозатором пипеточным 16 мкл гомогенной суспензии КА (при использовании капельницы – 1 капля).

Ингредиенты реакции перемешать осторожным покачиванием тест-карты на шейкере с частотой колебаний 200 об/мин в течение 8-10 мин или на ротаторе с частотой колебаний  $100\pm 50$  об/мин в течение 8 мин.

Результаты исследования считать положительными, свидетельствующими о наличии реакиновых антител в исследуемом образце, если на поверхности круга тест-карты с исследуемым образцом видны тёмные агрегаты (хлопья) частиц разной величины (крупные – реакция ++++, средние – реакция +++, мелкие – реакция ++) с четкими просветлениями жидкости между ними. Слабоположительный результат ++ соответствует картине, наблюдаемой при проведении исследования с К+ в разведении 1:А, где А – титр реакиновых антител, который определяется для каждой серии препарата на предприятии-изготовителе и указывается в рабочей инструкции по применению и паспорте на набор реагентов.

При отрицательном результате исследования, свидетельствующем об отсутствии реакиновых антител в исследуемом образце, на поверхности круга с образцом состояние реакционной среды не изменяется, наблюдается равномерное распределение частиц без образования агрегатов.

Образцы, показавшие в качественном исследовании положительные результаты (++++, +++) необходимо исследовать полуколичественным методом для определения титра реакиновых антител.

### **2. Определение титра реакиновых антител (полуколичественное исследование).**

2.1. На поверхности кругов тест-карты приготовить 2-кратные разведения образцов исследуемых сывороток на растворе натрия хлорида 0,9% изотоническом от 1:2 до 1 : 16 в соответствии с приведенной схемой постановки (см. таблицу 2). Для этого на поверхность кругов № 2-5 дозатором пипеточным внести по 50 мкл изотонического раствора. На поверхность круга № 1 внести 50 мкл образца и наконечником дозатора равномерно распределить по поверхности круга. На поверхность круга № 2 к 50 мкл изотонического раствора добавить 50 мкл этого же

образца и смесь осторожно перемешать пипетированием (разведение - 1 : 2). Далее 50 мкл разведения 1 : 2 исследуемого образца перенести на поверхность круга № 3, а оставшиеся в круге № 2 50 мкл равномерно распределить по поверхности круга. После тщательного перемешивания 50 мкл разведения 1 : 4 исследуемого образца перенести из круга № 3 в круг № 4 (разведение 1 : 8), а оставшееся количество равномерно распределить по поверхности круга № 3 и т.д. 50 мкл последнего разведения образца из круга удалить в ёмкость для инфицированного материала. После приготовления разведений на поверхность каждого круга внести по 16 мкл гомогенной суспензии КА (при использовании капельницы – по 1 капле).

Ингредиенты реакции перемешать осторожным покачиванием тест-карты на шейкере с частотой колебаний 200 об/мин в течение 8-10 мин или на ротаторе с частотой колебаний 100±50 об/мин в течение 8 мин, после чего немедленно провести учет результатов.

2.2. Учет результатов провести с учетом критериев оценки, приведенных в разделе XI.

Таблица 2

### Схема приготовления разведений исследуемых образцов

Операционная процедура (манипуляция)	№ круга (разведение исследуемого образца)				
	1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)
Внесение раствора натрия хлорида 0,9% изотонического	-	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Внесение исследуемого образца	50 мкл	50 мкл	-	-	-
Разведение образца (тщательное перемешивание и перенос в последующую лунку)	-	50 →	50 →	50 →	50 → удаление

**Внимание!** Если в РМП с КА получены положительные результаты исследования с разведением исследуемого образца 1:16, то исследование повторить на 10 реакционных кругах, приготавливая последовательные 2-кратные разведения образца до 1:512 (круг №10) на растворе натрия хлорида 0,9 % изотоническом.

Титром реагиновых антител считать максимальное разведение образца, дающее положительную реакцию – образование на поверхности круга тест-карты агрегатов.

2.3. После окончания исследования остатки кардиолипинового антигена из капельницы перелить в отдельный стеклянный флакон, хранить при температуре от 2 до 8°C и использовать до конца срока годности набора. Капельницы и тест-карты обеззаразить (см. раздел VI «Инструкции по безопасности»), затем тест-карты уничтожить, а капельницы промыть большим количеством проточной воды, ополоснуть дистиллированной водой и подсушить на воздухе.

### XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ


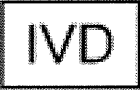

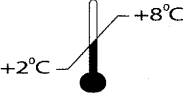


Срок годности – 18 месяцев. По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Транспортировать любым закрытым транспортом при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» по адресу: 107076, Россия, г. Москва, ул. Короленко, д. 3, строение 6, тел./факс (499) 785-20-16 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» по адресу: 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

#### XIV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	СЕ маркировка (Европейская директива 98/79/СЕ по <i>in vitro</i> диагностическим медицинским устройствам)
	Для « <i>in vitro</i> » диагностики
	Серия набора реагентов
	Рекомендуемый интервал температуры хранения
	Срок годности ДД/ММ/ГГ
	Смотрите инструкцию по применению

Директор по производству  
ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»



В. К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий»  
Академик РАН, профессор


А.А. Кубанова