

УТВЕРЖДАЮ

**Главный государственный
санитарный врач Российской Федерации**

Г. Г. Онищенко

2007.

№ 07-11/193-07

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
«ДС-РПГА-Анти-ЛЮИС»**

**Иммунодиагностикум эритроцитарный для выявления специфических
антител к *Treponema pallidum***

Набор включает в себя следующие реагенты:

СЭ (сенсibilизированные эритроциты) – формализированные куриные эритроциты, сенсibilизированные рекомбинантным антигеном – аналогом иммунодоминантного белка TmpA возбудителя сифилиса *Treponema pallidum*;

КЭ (контрольные эритроциты) – формализированные куриные эритроциты, не сенсibilизированные рекомбинантным антигеном;

К+ (положительный контрольный образец), инактивированный, жидкий – сыворотка крови человека, содержащая антитела к *Treponema pallidum*, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

К- (отрицательный контрольный образец), инактивированный, жидкий - сыворотка крови человека; не содержащая антитела к *Treponema pallidum*, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

РРО - раствор для разведения образцов.

Набор укомплектован двумя планшетами иммунологическими с U-образным профилем дна лунок для постановки РПГА и планшетом для предварительного разведения сывороток.

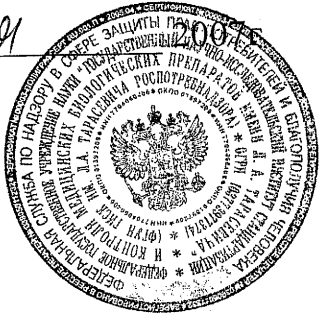
Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая постановку контрольных образцов.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора

« 04 » мая

Н.В. Медуницын



«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУ «ЦНИКВИ Росздрава»

А.А. Кубанова

А.А.Кубанова

2007 года



Описание реагентов:

СЭ – гомогенная взвесь красновато-коричневого цвета, разделяющаяся при хранении на гомогенный осадок красновато - коричневого цвета и прозрачную или слегка опалесцирующую, бесцветную или желтоватого цвета надосадочную жидкость;

КЭ – гомогенная взвесь красновато-коричневого цвета, разделяющаяся при хранении на гомогенный осадок красновато - коричневого цвета и прозрачную или слегка опалесцирующую, бесцветную или желтоватого цвета надосадочную жидкость;

К+ - прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость;

К- - прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета жидкость;

РРО - прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетового цвета жидкость.

Назначение

Набор предназначен для качественного и полуколичественного определения специфических антител к *Treponema pallidum* в сыворотке крови человека в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).

Способ применения

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

Перед использованием все реагенты набора следует выдержать 30 минут при температуре от 20 до 24 °С.

Для отбора проб использовать калиброванные дозаторы пипеточные с погрешностью измерения не более 5 %.

Не использовать иммунодиагностикум для исследования образцов плазмы крови.

Все растворы необходимо отбирать новым наконечником!

1. Приготовление рабочих растворов.

СЭ - сенсibilизированные эритроциты, готовы к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать до получения гомогенной взвеси. Оставшуюся неиспользованной суспензию СЭ хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой, в вертикальном положении на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

КЭ - контрольные эритроциты, готовы к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать до получения гомогенной взвеси. Оставшуюся неиспользованной суспензию КЭ хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой, в вертикальном положении на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению. Оставшийся неиспользованным К+ хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению. Оставшийся неиспользованным К- хранить во флаконе, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

РРО – раствор для разведения образцов, готов к применению. Оставшийся неиспользованным РРО хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

2. Меры безопасности

Контрольные образцы изготовлены на основе инактивированной при 56°С сыворотки крови человека. При работе с диагностикумом в лаборатории с исследуемыми образцами обращаются, как с потенциально инфекционным материалом: работают в резиновых перчатках, не пипетируют ртом. Твёрдые и жидкие отходы обеззараживают в соответствии с рекомендациями СП 1.3.1285-03, например: твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам и флаконы из-под реагентов) обеззараживают погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС)

или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение 1 ч. при температуре от 130 до 134 °С под давлением 2,0 кГс/см² (0,20 мПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживают добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30,0 г/л (длительность дезактивации – не менее 1 ч.), или кипячением в течении 30 мин., или автоклавированием в течении 45 мин. при температуре от 130 до 134 °С под давлением 2,0 кГс/см² (0,20 мПа). Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

3. Подготовка исследуемых образцов

Для исследования используют сыворотку крови человека.

Не используют плазму крови.

Каждый исследуемый образец отбирают новым наконечником! Для исключения ложных результатов исследуемые образцы отбирают и хранят в условиях, предотвращающих бактериальный рост.

Образцы сывороток крови с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией анализу не подлежат!

Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок осветляют центрифугированием.

Отобранные образцы сыворотки крови хранят не более 5 сут при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение образцов допустимо при температуре не выше минус 15 °С с исключением многократного замораживания-оттаивания (допустимо не более 1 раза).

4. Проведение РПГА.

4.1. Качественный анализ.

4.1.1. Перед постановкой РПГА исследуемые образцы сыворотки крови разводят в 20 раз. Для этого в лунки планшета для предварительного разведения образцов с помощью автоматической пипетки вносят по 190 мкл РРО и 10 мкл исследуемых образцов сыворотки крови, содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным пипетированием, при этом фиолетовый цвет раствора

в лунках должен измениться на голубой. Поскольку К+ и К- уже предварительно разведены 1:20, дополнительного разведения не требуется.

4.1.2. В лунки иммунологического планшета с U-образным профилем дна вносят по 25 мкл РРО. К+, К- и каждый предварительно разведенный в 20 раз исследуемый образец сыворотки вносят по 25 мкл в две лунки планшета - лунку нечетного и лунку четного рядов (конечное разведение сыворотки в лунках 1:40 с учетом их предварительного разведения). Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным пипетированием, после чего удаляют из каждой лунки дозатором по 25 мкл смеси в емкость для сбора инфицированного материала.

Примечание: разведение исходных сывороток 1:40 допускается делать в пробирках и флаконах. Для этого к 390 мкл РРО добавляют 10 мкл сыворотки и тщательно перемешивают. Затем вносят по 25 мкл разведенного исследуемого образца сыворотки в лунку нечетного и четного рядов планшета.

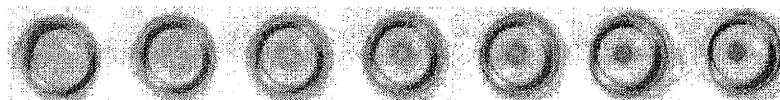
4.1.3. В лунки нечетных рядов планшета вносят по 25 мкл СЭ, в лунки четных рядов по 25 мкл КЭ. Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным постукиванием по краю планшета в течение 1 или 2 минут до равномерного распределения эритроцитов, планшет накрывают крышкой и выдерживают от 30 до 40 мин при комнатной температуре на светлой горизонтальной поверхности (**во время инкубации и при учете результатов не допускать перемещения планшета, избегать воздействия на планшет прямых солнечных лучей!**).

4.2. Учет результатов

Учёт результатов проводят визуально в условиях достаточного освещения, при этом выявляют разную степень агглютинации (Рис.1).

Рис.1

Внешний вид лунок с разной степенью агглютинации



Результат: 4+ 3+ 2+ 1+ ± отрицательный

4+ - равномерно распределенный по всему дну лунок осадок эритроцитов в виде зонтика с ровными или фестончатыми краями;

3+ - осадок эритроцитов в виде зонтика с ровными краями, занимающий не менее 2/3 лунки;

2+ - осадок эритроцитов в виде кольца, занимающего не менее 1/3 лунки, с видимым просветом в центре;

1+ - осадок эритроцитов в виде небольшого кольца, занимающего менее 1/3 лунки, с четко различимым просветом в центре;

± - плотный осадок эритроцитов со слабо различимым просветом в центре.

- отсутствие агглютинации - плотный осадок эритроцитов на дне лунки в виде точки «пуговки» без просвета в центре.

Реакцию учитывают, если в лунках с К+ и СЭ видна полная агглютинация эритроцитов, в лунках с К- и СЭ, К+ и КЭ, К- и КЭ агглютинация должна отсутствовать.

Результат считают положительным (образец содержит антитела к *Treponema pallidum*), если в лунке с СЭ выявлена агглютинация эритроцитов от 2+ до 4+.

Результат считают сомнительным, если степень агглютинации в лунке с СЭ составляет 1+. Образцы сыворотки, показавшие сомнительный результат РПГА, должны быть исследованы повторно. В случае получения аналогичного результата рекомендуется повторить исследование через 10-14 дней со свежим образцом сыворотки.

Результат считают отрицательным (образец не содержит антител к *Treponema pallidum*) в случае ± агглютинации и при ее отсутствии.

В лунках с исследуемым образцом сыворотки крови и КЭ агглютинация должна отсутствовать. Наличие агглютинации с КЭ свидетельствует о содержании в исследуемом образце неспецифических агглютининов, которые перед проведением реакции необходимо удалить путем их адсорбции на КЭ.

Для этого исследуемый образец разводят суспензией КЭ в соотношении 1:4 и выдерживают 1 ч при комнатной температуре, смесь центрифугируют в течение

8-10 мин при 1-1,5 тыс. об/мин. Отбирают 25 мкл супернатанта, разводят его РРО в соотношении 1:7, вносят по 25 мкл в 2 лунки планшета и проводят повторное тестирование образца с СЭ и КЭ в соответствии с п.4.1.3.

В качестве альтернативного варианта может быть предложен вариант, основанный на учете разницы титров исследуемого образца с контрольными и сенсibilизированными эритроцитами. С этой целью проводят двукратное титрование образца в двух вертикальных рядах планшета для постановки РПГА. Затем в первый ряд вносят СЭ, а во второй - КЭ. Если титр образца с СЭ больше титра образца с КЭ, то результат исследования считают положительным (образец содержит антитела к *Treponema pallidum*). Если титр образца с КЭ больше титра образца с СЭ или они равны, то рекомендовано провести исследование другим методом.

Положительные в РПГА образцы сывороток могут быть использованы для полуколичественного анализа - определения титра специфических антител к *T. pallidum*.

5. Полуколичественный анализ (титрование).

5.1. В лунки вертикальных рядов иммунологического планшета с U-образным профилем дна лунок вносят по 25 мкл РРО. Количество вертикальных рядов должно соответствовать числу тестируемых образцов плюс 1 ряд для титрования К+.

5.2. В лунку А1 вносят 25 мкл исследуемого положительного в качественном анализе образца сыворотки предварительно разведенного соответственно в 20 раз в планшете для разведения образцов. Содержимое лунки тщательно перемешивают осторожным пипетированием и переносят 25 мкл в лунку В1, после чего содержимое лунки тщательно перемешивают и переносят 25 мкл в лунку С1 и так до конца вертикального ряда, включая лунку Н1. 25 мкл содержимого лунки Н1 удаляют в емкость для инфицированного материала. Таким образом, в вертикальном ряду получают разведения сыворотки от 1:40 до 1:5120. Образцы следующих положительных образцов раститровывают аналогично. Одновременно с титрованием исследуемых образцов производят

титрование К+. Поскольку положительный контроль (К+) уже разведен 1:20, его используют, не делая предварительных разведений.

Примечание: если при постановке качественным методом предварительное разведение сыворотки составляло 1:40 (см. п. 4.1.2), в этом случае внести по 25 мкл РРО в лунки В1-Н1. В лунки А1 и В1 внести по 25 мкл сыворотки разведенной в 40 раз. Содержимое лунки В1 тщательно перемешать и перенести 25 мкл в лунку С1 и далее титрование проводить как описано выше в п. 4.1.3.

5.3. В каждую лунку вносят по 25 мкл СЭ (конечные разведения тестируемой сыворотки от 1:80 до 1:10240). Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным постукиванием по краю планшета в течение 1 или 2 минут до равномерного распределения эритроцитов, планшет накрывают крышкой и выдерживают от 30 до 40 мин при комнатной температуре на светлой горизонтальной поверхности (**во время инкубации и при учете результатов не допускать перемещения планшета, избегать воздействия на планшет прямых солнечных лучей!**).

5.4. Учет результатов.

Учет результатов провести как при постановке качественного варианта РПГА. Титром антител к *Treponema pallidum* следует считать то наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается реакция агглютинации 1+. Титр антител к *Treponema pallidum* в К+ должен быть не менее 1:1280 (данный титр устанавливается для каждой серии на предприятии-изготовителе).

Примечания

1. Пробы от пациентов с первичным сифилисом, содержащие, главным образом, специфические антитела класса М, могут давать в РПГА отрицательные результаты. В этих случаях проводят тестирование образцов сыворотки в иммуноферментной тест-системе (например «ИФА-АНТИ-ЛЮИС»), выявляющей IgM или суммарные антитела к *T. pallidum*, или повторяют тест через две недели со свежим образцом.

2. Сыворотки крови больных, получивших лечение по поводу сифилиса, могут сохранять положительные результаты РПГА. В исследованиях с использованием пар образцов сывороток от больных сифилисом до и после

лечения получена хорошая корреляция титров специфических антител с эффективностью проводимого лечения.

3. Ложноположительные результаты могут наблюдаться при ВИЧ инфекции, вирусном гепатите, онкозаболеваниях, хламидиозе, беременности – (Балашов М.П. 1981 г; Овчинников Н.М., Тимченко Г.Ф. 1973 г., Friedly G et all, 1983).

Большой процент (46,3%) неспецифических реакций с СЭ и КЭ выявлен для образцов сывороток от больных острым гепатитом А.

Форма выпуска

Иммунодиагностикум выпускают в виде набора, включающего:

СЭ - во флаконе	3,0 мл – 1 фл.
КЭ - во флаконе	4,0 мл – 1 фл.
К+ (инактивированный) – во флаконе	1,0 мл – 1 фл.
К- (инактивированный) – во флаконе	1,0 мл – 1 фл.
РРО - во флаконе	40,0 мл – 1 фл.

Реагенты помещают в пачку картонную, куда вкладывают два планшета для постановки РПГА, планшет для предварительного разведения сывороток и инструкцию по применению.

Условия хранения и транспортирования

Хранение – в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в сухом защищенном от света месте.

Транспортирование – в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С (допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 сут). Замораживание не допускается.

Срок годности – 18 месяцев.

По истечении срока годности препарат использованию не подлежит.

Условие отпуска - для диагностики «in vitro». Только для лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУ ЦНИКВИ Росздрава по адресу: 107076, Россия, г. Москва, ул. Короленко, д.3, строение 6, телефон (495) 964-39-17 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

Генеральный директор
ООО «НПО «ДС»



А.Н. Бурков

Зав.отделом микробиологии, д.м.н.
ФГУ «ЦНИКВИ Росздрава»

Н.В.Фриго