



Унитарное предприятие  
"Хозрасчетное опытное производство  
Института биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси"  
Республика Беларусь  
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3  
Факс (37517) 263-62-57

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИФИЛИСА *TREPONEMA PALLIDUM* В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

### ИФА-ТРЕП Набор Т2-монологит

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь  
06.07.2007 г.

#### 1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для первичного анализа сывороток и плазмы крови на наличие антител класса IgG к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum* методом иммуноферментного анализа.

#### 2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

##### 2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
1 Концентрат раствора для промывания планшетов (КРП)	2 флакона по 25 мл
2 Иммуносорбент	2 планшета
3 Раствор для разведения сывороток (РРС)	1 флакон, 20 мл
4 Раствор для разведения конъюгата (РПК)	1 флакон, 26 мл
5 Субстратный буферный раствор (СБР)	1 флакон, 14 мл
6 Конъюгат	1 микропробирка; 0,6 мл
7 Хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ)	1 флакон, 14 мл
8 Положительная контрольная сыворотка (К <sup>+</sup> )	1 микропробирка; 0,12 мл
9 Отрицательная контрольная сыворотка (К <sup>-</sup> )	1 микропробирка; 0,15 мл
10 Стоп-реагент	1 флакон, 25 мл

2.2 Основные компоненты набора ИФА-ТРЕП – иммуносорбент и конъюгат. Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, лунки которого сенсibilизированы рекомбинантными белками Trp 15, Trp 17, Trp 41, Trp 47 – аналогами белков *Treponema pallidum*. Конъюгат представляет собой моноклональные антитела против иммуноглобулинов класса IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфические к *Treponema pallidum*, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи конъюгата. После отмывания несвязанных компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты) и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках, которая при длине волны 450 нм пропорциональна концентрации специфических антител в образцах сыворотки или плазмы крови.

2.3 Набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроли).

#### 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Специфические антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях *E. coli* и содержащиеся в наборе ИФА-ТРЕП являются биологически безопасными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенци-

ально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

#### 4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы крови хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Если нет возможности провести анализ в этот срок, образцы необходимо заморозить (до температуры ниже минус 20 °С). При этом следует избегать замораживания образцов более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не использовать набор после окончания срока годности, а также смешивать компоненты наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента использовать отдельную емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускать подсыхания лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозирования и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

#### 5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
  - пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,020 до 0,400 мл (от 20 до 400 мкл);
  - пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
  - суховоздушный термостат установленный на температуру 37 °С;
  - мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
  - стакан мерный вместимостью 1000 мл;
  - ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
  - флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
  - клейкая пленка или крышка;
  - бумага фильтровальная;
  - перчатки резиновые хирургические;
  - вода дистиллированная;
  - контейнер для сбора твердых отходов;
  - контейнер для слива жидких отходов.

#### 6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 96 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление промывочного раствора

6.2.1 Если КРП содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть, отобрать 16 мл раствора в мерный стакан вместимостью 1000 мл, добавить 700 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении

**6.3.1** В чистый флакон отобрать 12,0 мл РРК и добавить 0,240 мл (240 мкл) конъюгата. Содержимое флакона перемешать, не допуская образования пены.

**ВНИМАНИЕ!** Раствор готовят непосредственно перед использованием!

**6.4** Приготовление раствора проявителя

**6.4.1** В чистый флакон вместимостью 20 мл внести 6,0 мл ТМБ и добавить 6,0 мл СБР. Смесь интенсивно встряхнуть.

**ВНИМАНИЕ!** Раствор ТМБ готовят непосредственно перед использованием!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

## 7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

**7.1** Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,350 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

## 8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

**8.1** Перед началом работы планшет освободить от упаковочного пакета.

**8.2** В каждую лунку планшета внести по 0,080 мл (80 мкл) РРС.

**8.3** В лунки планшета внести по 0,020 мл (20 мкл) образцов исследуемых сывороток, оставив свободными пять лунок первого ряда.

В две лунки (А<sub>1</sub>-В<sub>1</sub>) внести по 0,020 мл (20 мкл) (К<sup>+</sup>).

В три лунки (С<sub>1</sub>-Е<sub>1</sub>) внести по 0,020 мл (20 мкл) (К<sup>-</sup>).

При внесении сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках. Во время пипетирования происходит изменение цвета раствора.

**8.4** Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин.

**8.5** После окончания инкубации удалить раствор реагентов из лунок планшета и промыть лунки четыре раза промывочным раствором.

После последней аспирации удалить влагу, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

**8.6** Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата, приготовленного по п.6.3, накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

**8.7** После окончания инкубации удалить раствор конъюгата из лунок при помощи вошера и промыть лунки шесть раз промывочным раствором, приготовленным по п.6.2. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

**8.8** Внести в лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя, приготовленным по п.6.4. Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в темном месте при температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

**8.9** Остановить цветную реакцию внесением во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) раствора стоп-реагента. Не позже чем через 1 мин определить оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме - 450 нм относительно 620 нм или в одноволновом режиме при длине волны 450 нм.

## 9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

**9.1** Рассчитать среднее арифметическое значение ОП для лунки с (К<sup>-</sup>) – ОП<sub>ср</sub> (К<sup>-</sup>) и для лунок с (К<sup>+</sup>) – ОП<sub>ср</sub> (К<sup>+</sup>).

Если одно из трех значений ОП (К<sup>-</sup>) больше 0,1ОЕ, его не учитывают и ОП<sub>ср</sub> (К<sup>-</sup>) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (К<sup>-</sup>).

Проведение анализа считается корректным, если ОП<sub>ср</sub> (К<sup>-</sup>) не выше 0,1 ОЕ, ОП<sub>ср</sub> (К<sup>+</sup>) не ниже 0,6 ОЕ.

**9.2** Расчет параметров граничного значения (ГЗ) ОП и "серой зоны"

ГЗ рассчитывают, добавляя константную величину 0,12 к значению ОП<sub>ср</sub> (К<sup>-</sup>).

"Серая зона" – зона значений ОП, которая находится в промежутке от уровня ГЗ до значения, которое меньше этого уровня на 10%.

**9.3** Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП "серой зоны".

**9.4** Результаты считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ.

**9.5** Образцы со значениями ОП в пределах "серой зоны" считаются неопределенными.

**9.6** Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать повторно не менее, чем в двух лунках набора: образцы положительные в одной или больше лунках, следует считать положительными; образцы отрицательные в двух и более лунках, следует считать отрицательными.

## 10 ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА

**10.1** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

**1** Набор Т2–монолит: монолитный планшет; набор рассчитан на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: одна постановка – один планшет (96 лунок).

**2** Набор Т12–стрип: стриповый планшет; набор рассчитан на проведение 12 постановок иммуноферментного анализа: одна постановка – один стрип (16 лунок).

## 11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

**11.1** Набор транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

**11.2** Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

**11.3** Срок годности набора - 12 месяцев.

## Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.  
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.  
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85 Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы