

## УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА

При правильном проведении всех стадий анализа содержимое лунок с КОНТРОЛЕМ СУБСТРАТА и К- должно оставаться БЕСЦВЕТНЫМ или БЛЕДНО-ЖЕЛТЫМ, а содержимое лунок с К+ должно приобрести ЖЕЛТУЮ окраску.

### ВИЗУАЛЬНЫЙ УЧЕТ

Исследуемый образец оценивается как положительный, если имеются отчетливые различия в интенсивности его окрашивания по сравнению с растворами в лунках с КОНТРОЛЕМ СУБСТРАТА, и К-.

### ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ УЧЕТ

Измерение оптической плотности (ОП) проводится при длине волны 450 нм непосредственно в лунках планшета с помощью вертикального фотометра. В качестве кюветы сравнения служит лунка А1 с контролем субстрата. При правильном проведении анализа среднее значение в лунках с К+ должно быть не менее  $(0,7 \pm 0,10)$  единиц ОП, а в лунках с К- – не должно превышать  $(0,15 \pm 0,05)$  единиц ОП.

Оценка результатов производится следующим образом: если отношение среднего значения ОП ( $ОП_{\text{сред}}$ ) исследуемой сыворотки к  $ОП_{\text{сред}}$  К-  $\geq 3$  и при этом  $ОП_{\text{сред}}$  исследуемой сыворотки имеет значение выше 0,50 единиц, то этот результат следует оценивать как положительный, если отношение  $ОП_{\text{сред}}$  исследуемой сыворотки к  $ОП_{\text{сред}}$  К-  $\leq 3$  или  $ОП_{\text{сред}}$  исследуемой сыворотки  $\leq 0,5$ , то этот результат следует оценивать как отрицательный

### ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-систему выпускают в виде комплекта, упакованного в коробку. Один комплект рассчитан на проведение от 1 до 96 анализов, включая контроли.

### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Комплект тест-системы хранить при температуре  $(4 - 6)^\circ\text{C}$ . Транспортировку осуществлять всеми видами крытого транспорта при температуре не выше  $25^\circ\text{C}$  не более 2-х недель.

Срок годности тест-системы — 6 месяцев со дня выпуска.

При нарушении условий хранения, транспортировки и схемы постановки ИФА рекламации не принимаются.

В остальных случаях рекламации на качество тест-системы направляются по адресу учреждения изготовителя: 197101, С.Петербург, ул. Мира, д.14, ОНТ, телефакс (812) 233-17-03, тел. (812) 325-27-10, E-mail: pasteurdnt@yandex.ru

©НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1997



Для научных исследований

## ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Отдел Новых Технологий

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ тест-системы иммуноферментной для выявления антител класса IgM к лептоспирам серологических групп *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola* ИФА-анти-ЛЕП-IgM (ТУ 022-01967164-2015)

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Тест-система обладает способностью выявлять IgM-антитела к лептоспирам серологических групп *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola* в сыворотках крови больных на сравнительно ранних сроках болезни за счет их связывания со специфическими антигенами, сорбированными на поверхности лунок стрипов. Образующийся комплекс антиген-антитело выявляется с помощью пероксидазного конъюгата на основе моноклональных антител к тяжелой цепи IgM человека по появлению желто-коричневого окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Несмотря на то, что входящие в тест-систему контрольные сыворотки (К+, К-) инактивированы, с системой следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующими растворами (6%-ным раствором перекиси водорода или монохлорамина);
- использованные наконечники обрабатывать 20% раствором этилового спирта.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для серологической диагностики лептоспироза. Может быть использована при проведении текущей и ретроспективной диагностики лептоспироза при эпидемиологических исследованиях.

### СОСТАВ НАБОРА

1. Восьмилуночные стрипы, сорбированные Леп-антигеном, (Леп-антиген)..... 12 шт.
2. Сыворотка, содержащая IgM антитела к лептоспирам, (К+), 1.2 мл, (красный раствор) 1 пр.
3. Сыворотка, не содержащая IgM антител к лептоспирам, (К-), 1.2 мл, (зеленый раствор)..... 1 пр.
4. Концентрат конъюгата — моноклональные IgM-антитела, меченные пероксидазой хрена, (Концентрат конъюгата), 0.2 мл, (синий раствор)..... 1 пр.
5. Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащий детергент, (ФСРТ), 20.0 мл, (бесцветный раствор) ..... 1 фл.
6. Раствор для исследуемых проб, (РИП), 10. 0 мл..... 2 фл.

7. Цитратный буферный раствор с перекисью водорода, (ЦБП), 10.0 мл..... 1 фл.
8. Раствор для разведения конъюгата, (РРК), 10.0 мл..... 1 фл.
9. Раствор тетраметилбензидина, (ТМБ), (бесцветный или слегка голубоватый раствор), 2.5 мл..... 1 фл.
10. Раствор серной кислоты, (Стоп реагент), 5.0 мл, (бесцветный раствор) ..... 1 фл.
11. Полиэтиленовый пакет с молнией..... 1 шт.
12. Инструкция по применению ..... 1 шт

### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все растворы и реагенты необходимо выдержать перед началом работы при температуре (15 — 25) °С в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ (ИФА) рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.
2. В зависимости от числа исследуемых проб отбирают необходимое количество стрипов (полосок по 8 лунок в каждой). Остальные стрипы вынимают из рамки-держателя и хранят в закрытом полиэтиленовом мешке с молнией.
3. Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца необходимо брать с помощью индивидуального наконечника для пипеток.
4. **Раствор ФСРТ.** Для получения рабочего раствора содержимое флакона с концентратом ФСРТ доводят до 500 мл дистиллированной водой. Раствор хранят до 4 мес при температуре (4 — 6) °С.
5. **Исследуемые сыворотки.** Для получения необходимого (1 : 400) разведения следует произвести предварительное разведение, смешав 95 мкл СИНЕГО раствора РИП с 5 мкл исследуемой сыворотки с (разведение – 1 : 20), используя дополнительный неразборный планшет; при этом цвет раствора изменится от синего до изумрудного. Разведенную сыворотку не хранить.
6. **Раствор конъюгата.** Концентрат конъюгата разводят на растворе РРК 1 : 80. Необходимый объем раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов (см. пример 1). Хранят до 4 ч при температуре (4 — 6)°С.
7. **Субстратный раствор.** Готовят перед проведением ферментативной реакции. Необходимый объем раствора субстрата определяется числом используемых стрипов (см. пример 1). Хранению не подлежит.

### ПРИМЕР №1

Таблица  
расхода компонентов тест-системы

Количество одновременно используемых стрипов	Конъюгат (мкл)	Разводящий буфер для конъюгата (РРК) (мл)	ТМБ (мл)	ЦБП (мл)
1	15	1,2	0,2	0,8
2	30	2,4	0,4	1,6
3	40	3,2	0,6	2,4
4	50	4,0	0,8	3,2
5	60	4,8	1,0	4,0
6	70	5,6	1,2	4,8
7	80	6,4	1,4	5,6
8	90	7,2	1,6	6,4
9	100	8,0	1,8	7,2
10	110	8,8	2,0	8,0
11	120	9,6	2,2	8,8
12	130	10,4	2,4	9,6

### ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Для выявления антител к антигенам лептоспир возможно использование сыворотки крови людей как свежей, так и хранившейся при 2 – 10 °С не более 48 часов после забора крови, либо замороженной и хранившейся (исключить промежуточное оттаивание) при минус 20°С не более 6 месяцев.

1. **ГИДРАТАЦИЯ СОРБИРОВАННОГО ЛЕП-АНТИГЕНА.** Во все лунки стрипов вносят по 200 мкл раствора **ФСРТ**. Инкубируют в течение (1 — 2) мин при температуре (15 — 25) °С, затем раствор вытряхивают или удаляют насосом.  
**БУДЬТЕ ВНИМАТЕЛЬНЫ!** Стрипы могут выпадать из рамки-держателя.
2. **СВЯЗЫВАНИЕ IgM-антител.** Одну из лунок (A1) оставляют незаполненной (контроль субстрата), другую (B2) оставить незаполненной для контроля конъюгата.. Затем в две лунки вносят по 100 мкл положительного контроля (К+), в две другие — по 100 мкл отрицательного контроля (К-). Во все остальные лунки вносят по 95 мкл СИНЕГО раствора РИП и по 5 мкл предварительно, в 20 раз, разведенных на РИП исследуемых сывороток. (см. п. 5 «Подготовка реагентов») Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется, в конечном счёте, в 400 раз. Планшет закрывают крышкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 1 ч при температуре (37 ± 1)°С.  
После инкубации лунки промывают 3-хкратно раствором ФСРТ.
3. **СВЯЗЫВАНИЕ КОНЪЮГАТА.** Во все лунки, КРОМЕ A1, вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 1 ч во ВЛАЖНОЙ КАМЕРЕ.  
После инкубации лунки промывают 5-и кратно раствором ФСРТ.
4. **ПРОВЕДЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ.** Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. Планшет закрывают крышкой и выдерживают в темноте при температуре (15 — 25)°С в течение (20 ± 1) мин.
5. **ОСТАНОВКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ.** Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл раствора серной кислоты.