

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_{сред}) исследуемой сыворотки к ОП_{сред} **К-** ≥ 3 и при этом ОП_{сред} исследуемой сыворотки имеет значение выше 0,50 единиц, то этот результат следует оценивать как положительный, если отношение ОП_{сред} исследуемой сыворотки к ОП_{сред} **К-** ≤ 3 или ОП_{сред} исследованной 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

Набор ИФА-анти-ЛЕП-М следует хранить в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Допускается кратковременное (до 10 суток) хранение и транспортирование набора реагентов при температуре до 25 °С.

Гарантийный срок годности составляет 6 месяцев с даты утверждения ОБТК и указан на этикетке набора реагентов. По истечении срока годности набор реагентов использованию не подлежит.

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

По вопросам, касающимся качества набора следует обращаться в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по адресу:

197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14

Телефон (812) 233-20-92, (812) 644-63-17, факс (812) 644-63-10

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru;

официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru

Федеральное бюджетное учреждение науки САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. ПАСТЕРА

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)

197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14. Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 644-63-10

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; www.pasteurorg.ru

ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314; ИНН/КПП 7813047047/781301001

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов «Тест-система
иммуноферментная для выявления
антител класса IgM к лептоспирам
серологических групп
Icterohaemorrhagiae и Canicola»
(ИФА-анти-ЛЕП-IgM)
по ТУ 022-01967164-2015

*Для научных
исследований*

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 желтого 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. Восемилучные 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, (**РПК**), 10,0 мл 1 фл.
9. Раствор тетраметилбензидаина, (**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 2 — 8 °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. Разведённую сыворотку не хранить.
6. **Раствор конъюгата.** Концентрат конъюгата разводят на растворе РПК 1:80. Необходимый объем раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов (см. пример №1). Хранят до 4 ч при температуре 2 — 8 °С.
7. **Субстратный раствор.** В зависимости от количества используемых стрипов готовят необходимый объем субстратного раствора путем смешивания соответствующих объемов реагента ТМБ и ЦБП перед проведением ферментативной реакции. Полученный субстратный раствор должен оставаться бесцветным или слегка голубоватым. Необходимый объем раствора субстрата определяется числом используемых стрипов (см. пример №1). Полученный субстратный раствор хранению не подлежит.

ПРИМЕР №1

Таблица расхода компонентов тест-системы

Количество одновременно используемых стрипов	Конъюгат (мкл)	Разводящий буфер для конъюгата (РПК) (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 (А1) оставляют незаполненной (контроль субстрата), другую (В2) 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 КОНЬЮГАТА.** Во все лунки, КРОМЕ А1, 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-икратно 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.