

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 IgG к антигенам коксиелл
Бернета»

(ИФА-анти-Ку-G)

по ТУ 21.20.23-024-01967164-2018

Регистрационное
удостоверение
№ РЗН 2019/8718
от 06 августа
2019 года

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для серологической текущей и ретроспективной *in vitro* диагностики Ку-лихорадки (коксиеллеза) по наличию антител IgG-класса в сыворотке крови человека с помощью качественного иммуноферментного анализа и осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора за коксиеллезом (Ку-лихорадкой). Кроме того, Набор реагентов может быть применен для осуществления мероприятий по контролю и профилактике внебольничных пневмоний (СП 3.1.2.3116-13 «Профилактика внебольничных пневмоний» и МУ 3.1.2.3047-13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями») для исключения лихорадки Ку.

Потенциальными потребителями набора реагентов являются специалисты учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (центры гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, противочумные учреждения, научные организации, санитарно-эпидемиологические службы министерств и ведомств), а также специалисты медицинских учреждений, имеющие специальность врача клинической лабораторной диагностики или биолога согласно требованиям Приказов Минздравсоцразвития №415н от 7.07.2009 г. и №541н от 23.07.2010 г.

Целевым анализом, выявляемым Набором реагентов, являются сывороточные антитела класса IgG к антигенам *Coxiella burnetii*, присутствие которых в сыворотке свидетельствует об инфицированности исследуемого человека возбудителем лихорадки Ку и при наличии клинико-эпидемиологических данных позволяет диагностировать лихорадку Ку (раздел 4.4 Санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.7.2811-10 «Профилактика коксиеллеза (Лихорадка Ку)»). IgG-антитела к коксиеллам Бернета могут сохраняться в течение длительного времени после перенесения заболевания, поэтому их обнаружение при стертой клинической картине является основанием для повторного исследования через 10-12 дней. Четырехкратное увеличение титра

коксиеллезных антител в «парных сыворотках» указывает на текущую инфекцию, а отсутствие изменения титра антител свидетельствует о перенесенном заболевании в прошлом.

СОСТАВ НАБОРА

Набор рассчитан на исследование 93 образцов сывороток крови в варианте скрининга, включая контроли (табл. 1).

Таблица 1 - Состав набора.

Наименование реагента	Описание	Количество в наборе
Сыворотка крови, содержащая IgG-антитела к коксиеллам Бернета (К+)	Прозрачная жидкость красного цвета	1,2 мл – 1 пр.
Сыворотка крови, не содержащая IgG-антитела к коксиеллам Бернета (К–)	Прозрачная жидкость зелёного цвета	1,2 мл – 1 пр.
Концентрат моноклональных антител к IgG человека, меченных пероксидазой хрена (концентрат конъюгата)	Прозрачная жидкость синего цвета	0,6 мл – 1 пр.
Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСРТ, концентрат)	Прозрачная бесцветная жидкость	20 мл – 1 фл.
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБП)	Прозрачная бесцветная жидкость	10 мл – 1 фл.
Раствор для разведения конъюгата (РПК)	Прозрачная бесцветная жидкость	11 мл – 1 фл.
Раствор для разведения исследуемых проб (РИП)	Прозрачная жидкость сине-фиолетового цвета	10 мл – 2 фл.
Раствор тетраметилбензидина (ТМБ)	Прозрачная жидкость слегка голубоватого цвета	2,5 мл – 1 фл.
Раствор серной кислоты (Стоп-реагент)	Прозрачная бесцветная жидкость	5 мл – 1 фл.
Иммуносорбент	96-луночный планшет, цельный или разборный с прозрачными лунками, с иммобилизованными антигенами коксиелл Бернета	1 шт.
Хлорид натрия	Кристаллы белого цвета	10 г – 1 уп.

РЕКЛАМАЦИИ

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к антигенам коксиелл Бернета» (ИФА-анти-Ку-G), следует обращаться к предприятию-изготовителю Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (ФБУН НИИЭМ 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

Для постановки окончательного диагноза Ку-лихорадки необходим комплекс серологических, клинических и эпидемиологических данных.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Хранение

Набор ИФА-анти-Ку-G 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.

В случае дробного использования (независимо от кратности) после вскрытия первичной упаковки компоненты Набора необходимо хранить следующим образом:

- неиспользованные стрипы иммуносорбента можно хранить в тщательно герметизированном полиэтиленовом пакете типа «зип-лок» в течение всего срока годности набора при температуре 2 – 8 °С;

- концентрат ФСРТ после вскрытия флакона можно хранить во флаконе с плотно закрытой винтовой крышкой в течение всего срока годности набора при температуре 2 – 8 °С, рабочий раствор ФСРТ можно хранить в течение всего срока годности набора при температуре 2 – 8 °С;

- концентрат конъюгата после вскрытия можно хранить в плотно закрытой пробирке в течение всего срока годности набора при температуре 2 – 8 °С, рабочий раствор концентрата конъюгата в РРК можно хранить не более 4 ч при температуре 2 – 8 °С;

- растворы ЦБП, РРК и ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить во флаконах с плотно закрытыми винтовыми крышками в течение всего срока годности набора при температуре 2 – 8 °С, субстратный раствор (ЦБП + ТМБ) хранению не подлежит;

- остальные растворы - К+, К-, Стоп-реагент, РИП - можно хранить в течение всего срока годности набора при температуре 2 – 8 °С.

При необходимости возможно использование компонентов ЦБП, ТМБ, РРК, РИП, Стоп-реагент из других серий Набора реагентов.

Срок годности набора реагентов

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.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуемые образцы сыворотки крови хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток от момента взятия крови. Допускается хранение сыворотки в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Перед использованием образцы размораживают при температуре от 16 до 25 °С и перемешивают встряхиванием. Образцы проб сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием 10 мин при 6000 об/мин. Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом в виду возможной интерференции гемоглобина, липидов и бактериальных продуктов с косиеллезными антителами, что может привести к ложноположительным результатам. Обязательным условием является разбавление анализируемой сыворотки перед использованием в 400 раз, что гарантирует нивелирование действия возможных интерферентов, присутствующих в следовых количествах.

Повторное замораживание сыворотки не допускается.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка сывороток

Провести предварительное разведение (1:20), смешав 5 мкл исследуемой сыворотки с 95 мкл РИП (разведение – 1:20). Для этого используют дополнительный 96-луночный планшет. В случае необходимости титрования сывороток разводить их раствором РИП с шагом 2. Разведённые сыворотки хранению не подлежат.

Подготовка раствора ФСРТ

Для получения рабочего раствора ФСРТ содержимое флакона с концентратом ФСРТ перенести в мерную колбу ёмкостью 500 мл и довести объём до метки дистиллированной водой. Перелить содержимое колбы в стакан, добавить содержимое пакета с хлоридом натрия и перемешивать до полного растворения последнего. Полученный раствор следует хранить не более 5 суток при температуре от 16 до 25 °С и не более 30 суток при температуре от 2 до 8 °С.

Подготовка раствора конъюгата

Концентрат конъюгата развести на растворе РРК 1:20. Необходимый объём раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов (см. табл. 2). Полученный раствор следует хранить не более 4 ч при температуре 4-6 °С.

Подготовка субстратного раствора

В зависимости от количества используемых стрипов готовят необходимый объём субстратного раствора путем смешивания соответствующих объёмов

реагента ТМБ и ЦБП перед проведением ферментативной реакции. Полученный субстратный раствор должен оставаться бесцветным или слегка голубоватым. Необходимый объём раствора субстрата определяется числом используемых стрипов (таблица 2). Полученный субстратный раствор хранению не подлежит.

Таблица 2 - Расход компонентов тест-системы.

Количество стрипов	Концентрат конъюгата (мл)	РПК (мл)	ТМБ (мл)	ЦБП (мл)
1	0,05	0,95	0,2	0,8
2	0,10	1,90	0,4	1,6
3	0,13	2,47	0,6	2,4
4	0,17	3,23	0,8	3,2
5	0,21	3,99	1,0	4,0
6	0,25	4,75	1,2	4,8
7	0,29	5,51	1,4	5,6
8	0,33	6,27	1,6	6,4
9	0,37	7,03	1,8	7,2
10	0,44	8,37	2,0	8,0
11	0,46	8,74	2,2	8,8
12	0,50	9,50	2,4	9,6

ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Регидратация сорбированного Ку-антигена. Перед использованием иммуносорбент промыть раствором ФСРТ: в лунки внести по 250 мкл раствора ФСРТ и выдержать в течение 5 мин при температуре 20±2 °С. Затем раствор из лунок удалить с помощью автоматического промывателя (вошера) или вытряхнуть.

Одну из лунок (А1) оставить незаполненной в качестве контроля субстрата, другую (В1) оставить незаполненной для контроля конъюгата, в две лунки (А2 и В2) внести по 100 мкл раствора К+, в две другие (А3 и В3) – по 100 мкл раствора К-. В остальные лунки внести по 95 мкл раствора ФСРТ и по 5 мкл предварительно разведённой в РИП в 20 раз исследуемой сыворотки. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется, в конечном счёте, в 400 раз. Планшет закрыть крышкой и выдержать во влажной камере при температуре 37±1 °С в течение 1 ч. После инкубации содержимое лунок удалить автоматическим отсасывателем в сосуд, заполненный до половины 6% раствором перекиси водорода, затем лунки промыть, внося в каждую не менее 250 мкл

раствора ФСРТ и удаляя раствор автоматическим отсасывателем. Промывать 3 раза. После последней промывки удалить остаточную влагу постукиванием перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Связывание конъюгата. Во все лунки, за исключением А1, внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрыть крышкой или поместить во влажный полиэтиленовый пакет и инкубировать при температуре 37±1 °С в течение 1 ч во влажной камере. Затем содержимое лунок удалить автоматическим отсасывателем и промыть 5 раз.

Проведение ферментативной реакции. Перед проведением ферментативной реакции планшет промыть дистиллированной водой для удаления остатков ФСРТ. Для этого во все лунки внести по 250 мкл дистиллированной воды и выдержать 5 мин при температуре 20±2 °С, затем воду удалить автоматическим отсасывателем. Во все лунки планшета внести по 100 мкл субстратного раствора. Планшет поместить в защищенное от света место и выдержать 20±2 мин при 15–25 °С.

Остановка ферментативной реакции. Во все лунки внести по 50 мкл Стоп-реагента.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов анализа проводить спектрофотометрическим методом не позднее, чем через 30 мин после внесения Стоп-реагента при длине волны 450 нм с помощью анализатора иммуноферментного ИФА-ОЭП-001 (г. Москва) или аналогичного ему. При проведении измерений осуществить установку «нулевого» уровня ОП по лунке А1 («бланк») с контролем субстратного раствора, вводя на приборе автоматический режим вычитания ОП А1 из значений ОП во всех остальных лунках. Результат учитывается, если значение ОП в лунках с К- не превышает 0,10 оптических единиц (о.е.), а значение ОП в лунках с К+ не менее 0,70 о.е.

Оценка результатов производится следующим образом. Если отношение среднего значения ОП (ОП_{ср}) исследуемой сыворотки к ОП_{ср} К- ≥3 и при этом ОП_{ср} исследуемой сыворотки имеет значение выше 0,50 о.е., то этот результат следует оценивать как положительный и сыворотка содержит антитела класса IgG к антигену коксиелл Бернета. Если отношение ОП_{ср} исследуемой сыворотки к ОП_{ср} К- меньше 3 или ОП_{ср} исследуемой сыворотки ≤0,50 о.е., то этот результат следует оценивать как отрицательный и сыворотка не содержит антител класса IgG к антигену коксиелл Бернета.

Положительный результат ИФА, то есть выявление антител к *C.burnetii*, может свидетельствовать как о текущем заболевании Ку-лихорадкой, так и об инфицированности (или иммунизации) *C.burnetii* в прошлом.

Для дифференциации положительных результатов ИФА анамнестического характера от текущего заболевания, следует сравнить титры сывороточных антител к коксиеллезным антигенам в динамике болезни с интервалом 10 – 12 дней в ранний период её клинических проявлений.

Титром антител считают наибольшее разведение сыворотки, при котором результаты ИФА оцениваются как положительные. Нарастание титров в 4 и более раз подтверждает наличие текущей коксиеллезной инфекции. В случае отсутствия возможности исследования парных сывороток, обнаружение коксиеллезных антител при значительных разведениях сыворотки (1:3200 и выше) может свидетельствовать в пользу недавно перенесённой Ку-лихорадки.