

Оценка результатов производится следующим образом: если отношение (А) среднего значения ОП (ОП_{сред}) исследуемого образца к ОП_{сред} К- больше или равно 3 (А ≥ 3), то этот результат следует оценивать как положительный, если отношение ОП_{сред} исследуемого образца к ОП_{сред} К- меньше 3 (А < 3), то этот результат следует оценивать как отрицательный. Положительный результат ИФА свидетельствует о наличии антигенов коксиелл Бернета в исследуемом материале, отрицательный – о том, что данным методом антигены не обнаружены.

Пример №2

Образец	ОП при 450 нм	Среднее значение ОП при 450 нм	Значение А (ОП _{сред} / ОП _{сред} К-)
К-	0,17	0,18	
К-	0,19		
К+	0,92	0,90	
К+	0,88		
Проба 1	0,98	0,96	0,96/0,18=5,3
Проба 1	0,94		
Проба 2	0,24	0,22	0,22/0,18=1,2
Проба 2	0,20		

Проба 1: А = 0,96/0,18=5,3 – результат следует оценивать как положительный.

Проба 2: А = 0,22/0,18=1,2 – 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-Ку-антиген 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

антигенов коксиелл Бернета»

(ИФА-Ку-антиген)

по ТУ 015-01967164-2015

Для научных исследований

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Тест-система обладает способностью выявлять антигены коксиелл Бернета (Ку-антиген) за счет их связывания с поликлональными антителами, сорбированными на поверхности лунок стрипов. Образующийся комплекс антитело-антиген выявляется с помощью пероксидазного конъюгата на основе поликлональных антител по появлению желтого окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Несмотря на то, что входящие в тест-систему контрольные образцы (К+ и 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% раствором перекиси водорода или монохлорамина);
- использованные наконечники обрабатывать 20% раствором этилового спирта.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для выявления Ку-антигена в объектах внешней среды, (смывы) и материалах биологического происхождения (органы животных, клещи).

СОСТАВ НАБОРА

1. 8-луночные стрипы, сорбированные антителами к Ку-антигену 12 шт.
2. Позитивный контрольный образец, содержащий антиген коксиелл Бернета, (К+), (красный раствор), 1,2 мл..... 1 пр.
3. Негативный контрольный образец, содержащий гетерологический антиген, (К-), (зеленый раствор), 1,2 мл 1 пр.
4. Конъюгат — поликлональные антитела к коксиеллам Бернета, меченные пероксидазой хрена, (Концентрат конъюгата), (синий раствор), 0,2 мл..... 1 пр.
5. Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащий детергент — твин-80, (ФСРТ), (бесцветный раствор), 20,0 мл 1 фл.
6. Цитратный буферный раствор с перекисью водорода, (ЦБП), (бесцветный раствор), 10,0 мл..... 1 фл.
7. Раствор для разведения конъюгата, (РРК), (бесцветный раствор), 10,0 мл 1 фл.

8. Раствор тетраметилбензидина, (ТМБ), (бесцветный или слегка голубоватый раствор), 2,5 мл..... 1 фл.
9. Раствор серной кислоты, (Стоп реагент), (бесцветный раствор), 5,0 мл..... 1 фл.
10. Полиэтиленовый пакет с молнией..... 1 шт.
11. Инструкция по применению 1 шт.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все растворы и реагенты необходимо выдержать перед началом работы при температуре 18 — 25 °С в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ (ИФА) рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.
2. Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца необходимо брать с помощью индивидуального наконечника для пипеток.
3. В зависимости от числа исследуемых проб отбирают необходимое количество стрипов. Остальные стрипы вынимают из рамки-держателя и хранят в закрытом полиэтиленовом пакете с молнией при температуре 2 — 8 °С.
4. **Материал для исследования.** а) Внутренние органы животных, клещей растирают в стерильной фарфоровой ступке и готовят 25% суспензию в 0,9% растворе хлорида натрия. Полученную суспензию подвергают трехкратной процедуре замораживания-оттаивания, 2 — 5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Перед исследованием тампон тщательно отжимают, содержимое пробирки инактивируют в водяной бане при температуре 100 °С в течение 20 мин и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 15 мин. Дальнейшее исследование проводят с супернатантом. б) Смывы берут ватным тампоном, смоченным 0,9 % раствором хлорида натрия, с поверхности не менее 200 — 300 см². Тампон помещают в пробирку, содержащую на водяной бане при температуре 100 °С в течение 20 мин.
5. **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.
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 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 (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

! Обработка исследуемого материала до инактивации возбудителя требует соблюдения инструкций, изложенных в сборнике санитарных и ветеринарных правил «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных» (Москва, 1996).

ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

1. **ГИДРАТАЦИЯ сорбированных антител к Ку-антигену.** Во все лунки стрипов внести по 200-300 мкл раствора ФСРТ. Инкубировать в течение 1–2 мин при температуре 15–25°С. Удалить содержимое лунок в ёмкость с дезинфицирующим раствором с помощью отсасывателя. **БУДЬТЕ ВНИМАТЕЛЬНЫ!** Стрипы могут выпасть из рамки-держателя.
2. **СВЯЗЫВАНИЕ Ку-антигена.** Одну из лунок (А1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В две лунки вносят по 100 мкл КРАСНОГО раствора К+, в две другие лунки вносят по 100 мкл ЗЕЛЕННОГО раствора К-, в остальные лунки вносят по 100 мкл исследуемых образцов (см п. 4 «Подготовка реагентов»). Планшет закрывают крышкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 1 ч при температуре 37±1°С. После инкубации лунки промывают 3-хратно 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. После инкубации лунки промывают 5-тикратно 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.

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 (0,60 ± 0,10) единиц ОП, а в лунках с К- — не должно превышать (0,15 ± 0,05) единиц ОП.