

Оценка результатов производится следующим образом: если отношение (А) среднего значения ОП (ОП_{сред}) исследуемого образца к ОП_{сред} К- больше или равно 3 (**A ≥ 3**), то этот результат следует оценивать как положительный, если отношение ОП_{сред} исследуемого образца к ОП_{сред} К- меньше 3 (**A < 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: A = 0,96/0,18=5,3– результат следует оценивать как положительный.

Проба 2: A = 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

Комплект тест-системы хранить при температуре (4 — 6)°С. Транспортировку осуществлять всеми видами крытого транспорта при температуре не выше 25 °С не более 2 недель.

Срок годности тест-системы —6 мес 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



Утверждено учёным советом ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

«18» февраля 2015 г.

Для научных исследований

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени ПАСТЕРА Отдел Новых Технологий

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
тест-системы иммуноферментной для выявления антигенов коксиелл Бернета
ИФА-Ку-антиген
(комплект N1)

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 тетраметилбензидаина, (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 (4-6)°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, 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 2 — 5 мл 0.9 % раствора хлорида натрия. Перед исследованием тампон тщательно отжимают, содержимое пробирки инактивируют 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 (4 — 6)°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 (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

! 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 выпадать 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 **ЗЕЛЕНОГО** 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 КОНЪЮГАТА.** 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 лунки 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.