

## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению тест-системы иммуноферментной для выявления антител класса G к Gardnerella vaginalis

### "Гарднерелла-G"

Метод основан на связывании антител к Gardnerella vaginalis, присутствующих в тестируемом образце, с антигеном гарднереллы, сорбированном на поверхности лунок планшета. С образовавшимся иммунным комплексом связывается конъюгат (антитела к IgG человека, конъюгированные с ферментом - пероксидазой хрена). Далее, после добавления субстрата и хромогена (ТМБ), в ходе ферментативной реакции происходит конверсия окраски ТМБ – раствор приобретает синий цвет, а после остановки реакции стоп-реагентом – желтый. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию в образце антител к гарднерелле.

#### Назначение

Тест-система (набор реагентов) предназначена для выявления антител класса G к Gardnerella vaginalis в сыворотке или плазме крови человека.

#### Комплектация

1. **Иммуносорбент** - планшет, сорбированный антигеном Gardnerella vaginalis, в пластиковом фольгированном пакете - 1 шт
2. **ФСБ-Т** - фосфатно-солевой буферный раствор с твином, **25x концентрат** – прозрачная, слегка опалесцирующая бесцветная жидкость - 26 мл
3. **РБР-С** - разводящий буферный раствор для сывороток – прозрачная опалесцирующая жидкость **фиолетового** цвета - 12 мл
4. **Конъюгат** - моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с ПХ – прозрачная опалесцирующая жидкость **зеленого** цвета - 12 мл
5. **К+** - положит. контрольный образец (инактивир. сыв-ка крови человека, содерж. IgG к гарднерелле) – прозр. опалесцир. жид-ть **красного** цвета - 1,5 мл
6. **К-** - отрицат. контр. образец (инактивир. сыв-ка крови человека, не содерж. антител к гарднерелле) – прозр. опалесцир. жид-ть **желтого** цвета - 2,5 мл
7. **ТМБ - субстрат** - хромоген тетраметилбензидин + субстрат H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – бесцветная или чуть желтоватого оттенка жидкость - 12 мл
8. **Стоп-реагент** - прозрачная бесцветная жидкость - 6,0 мл      Заклейка для планшета - 3 шт      Инструкция - 1 шт

Тест-система "Гарднерелла-G" рассчитана на 96 определений, включая контрольные образцы.

#### Способ применения

##### Приготовление реагентов

1. Раствор **ФСБ-Т (1X)**: содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл водой дистиллированной (при наличии во флаконе осадка солей флакон выдержать при 37 °С до их полного растворения). Хранение – в течение 1 месяца при температуре от +2 до +8 °С.

При использовании одного или нескольких стрипов планшета необходимое количество ФСБ-Т готовится в соответствии с таблицей:

Количество используемых стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25X концентрат ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
Вода дистиллированная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650

2. Все остальные реагенты готовы к использованию.

##### Подготовка исследуемых образцов

Отобранные образцы сывороток (плазмы) хранят при температуре +2...+8° С не более 72 часов, для более длительного хранения их замораживают и хранят при минус 18° С и ниже, избегая многократного замораживания-оттаивания. После размораживания образцы необходимо тщательно перемешать. Пробы, содержащие агрегаты или осадок, осветляют центрифугированием. Каждый образец отбирается индивидуальным наконечником. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

##### Проведение анализа

1. Открыть коробку и выдержать набор при комнатной температуре 30 мин. Пакет с иммуносорбентом во время выдержки не открывать!
2. Встряхнуть все флаконы с реагентами.
3. Извлечь планшет **с иммуносорбентом** из пакета. Определить необходимое для проведения анализа количество стрипов (необходимое количество лунок = количество образцов + 3 контроля). Неиспользуемые стрипы извлечь из рамки планшета, поместить их обратно в пакет и плотно закрыть на защелку (пакетик с поглотителем влаги должен оставаться внутри).
4. Планшет с отобранными стрипами промыть один раз раствором ФСБ-Т, внося в каждую лунку по 250-300 мкл раствора (лунки должны заполняться полностью, но не переливаться). По окончании промывки остатки жидкости удалить постукиванием планшета по бумажному полотенцу (а при необходимости и оставить на нем (но не более 3 мин) в перевернутом положении до момента внесения реагентов).
5. В любую одну лунку внести 100 мкл К+, в две другие лунки - по 100 мкл К- (при постановке анализа на одном стрипе допускается использовать для К- и К+ по одной лунке).
6. В остальные лунки внести по 100 мкл РБР-С, затем туда же внести по 10 мкл исследуемых образцов с пипетированием 5 раз.
7. Планшет закрывает заклеивкой, дополнительно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 20 сек (не допускать разбрызгивания жидкости в лунках) и инкубировать в течение **30 мин при 37° С**. Рекомендуется использовать инкубатор со встряхиванием (шейкер-инкубатор).
8. Удалить жидкость из лунок в емкость с дезинфицирующим раствором и промыть планшет пять раз раствором ФСБ-Т, как в п. 4.
9. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата, заклеить планшет и инкубировать в течение 30 мин при 37° С.
10. Удалить жидкость из лунок и промыть планшет пять раз раствором ФСБ-Т, как в п. 4.
11. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ-субстрата, заклеить планшет и поместить на 15 мин в защищенное от света место при 37° С.
12. Внести во все лунки по 50 мкл стоп-реагента для остановки реакции (соблюдать ту же последовательность добавления реагента, что и при внесении ТМБ-субстрата), осторожно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола и провести учет результатов не позднее, чем через 10 мин после внесения стоп-реагента.

### Учет и интерпретация результатов

Проводят спектрофотометрически при длине волны 450 нм с настройкой “нуля” прибора (бланк) по воздуху. Проведение анализа считают корректным, если среднее значение оптич. плотности (ОП) в лунках с К- не более 0,2 оптич. единиц (о.е.), а в лунке с К+ - не менее 0,5 о.е.

Расчет ОПкрит:  $ОПкрит = ОПср К- + 0,25$ , где ОПср К- - среднее значение ОП К- по двум лункам

Результат анализа считают положительным, если ОП исследуемого образца превышает (ОПкрит + 10%), и отрицательным, если ОП образца менее (ОПкрит – 10%).

При попадании ОП образца в “серую зону” (ОПкрит ± 10%) результат считается пограничным.

Результат анализа для большей информативности может быть представлен в виде индекса антител: индекс антител = ОП образца : ОПкрит

Индекс	Результат
< 0,9	Отрицательный, образец оценивается как не содержащий антител класса G к Gardnerella vaginalis
0,9 – 1,1	Пограничный (серая зона)
> 1,1	Положительный, образец оценивается как содержащий антитела класса G к Gardnerella vaginalis

Для корректной интерпретации результатов анализа обращайтесь к руководствам по серологическим методам исследований.

Внимание: Полученные результаты не могут служить основанием для постановки диагноза и должны интерпретироваться только в комплексе с анамнезом, данными клинического наблюдения и результатами других диагностических процедур.

### Срок годности, условия хранения и транспортирования

Срок годности набора 12 месяцев. Хранить при температуре +2...+8° С. Транспортирование производить всеми видами крытого транспорта при тех же условиях. Допускается транспортирование при темп-ре не выше +25 °С в течение не более 5 суток. Не допускать замораживания. Срок годности компонентов набора после вскрытия - в соответствии с датой срока годности, указанной на упаковке. Хранение при +2...+8°С.

### Краткая схема проведения ИФА «Гарднерелла - G»

**ВНИМАНИЕ!** Прежде, чем пользоваться данной схемой, внимательно ознакомьтесь со всей инструкцией к тест-системе

Наименование операции	Время и темп-ра инкубации
Необходимое количество стрипов иммуносорбента промыть 1 раз однократным ФСБ-Т	
100 мкл К+ 100 мкл К- (2 лунки) 100 мкл РБР-С + 10 мкл исследуемых образцов Пипетирование 5 раз Перемешивание 20 сек	30 мин при 37° С
Промыть 5 раз однократным ФСБ-Т	
100 мкл конъюгата	30 мин при 37° С
Промыть 5 раз однократным ФСБ-Т	
100 мкл ТМБ-субстрата	15 мин при 37° С
50 мкл стоп-реагента	
Измерить ОП при 450 нм	

#### Необходимые материалы, не входящие в состав набора:

Одноканальные варипипетки на 10-40 мкл, 20-200 мкл и 200-1000 мкл  
Ванночки для реагентов  
Наконечники для варипипеток  
(Восьмиканальная варипипетка на 50-300 мкл)  
Термостат (шейкер-инкубатор) на 37° С  
Фотометр для 96-луночных планшетов с фильтром 450 нм  
Дистиллированная вода  
Автоматический промыватель для планшетов (или восьмиканальная варипипетка на 50 - 300 мкл)

#### Предупреждения и рекомендации

1. Перед использованием тест-системы необходимо внимательно изучить данную инструкцию и строго соблюдать изложенные в ней требования. Производитель не несет ответственности за последствия, вызванные возможной некорректной работой тест-системы в случае несоблюдения требований инструкции.
  2. Все тестируемые образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал и при работе с ними и последующей утилизации необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.
  3. Использовать только компоненты, входящие в состав набора. Не использовать компоненты из наборов разных серий.
  4. Для каждого реагента и исследуемого образца должны быть использованы новые наконечники для пипеток.
  5. Категорически запрещается производить раскапывание реагентов в лунки непосредственно из флаконов в составе набора. Необходимо отлить предварительно рассчитанное количество реагента (с некоторым запасом) в чистую ванночку или дополнительную пробирку и уже из них раскапывать в лунки. Оставшиеся неиспользованными растворы категорически запрещается переливать обратно во флаконы с исходными реагентами.
  6. ТМБ-субстрат чувствителен к свету. Необходимо также исключить контакт этого реагента с окислителями, такими, как хлорсодержащие моющие средства и металлы.
  7. ТМБ-субстрат, а также стоп-реагент могут вызывать раздражение кожи и слизистых поверхностей при попадании на них. В этом случае необходимо обильно промыть водой место контакта и обратиться за медицинской помощью.
- \* \* \*
- Необходимо предъявлять высокие требования к чистоте лабораторной посуды, наконечников, ванночек и т.п., поскольку даже следы применяемых дезинфицирующих и моющих средств могут приводить к искажению результатов ИФА. Предпочтительно использование одноразовой посуды.
  - В процессе мытья внутренней поверхности ванночек для реагентов должна тщательно протираться салфеткой под струей проточной воды с последующим ополаскиванием дистиллированной водой.
  - Для ТМБ-субстрата и стоп-реагента должны быть выделены индивидуальные ванночки, предназначенные исключительно для каждого из этих реагентов. Эти ванночки запрещается использовать для других реагентов.
  - Некоторые возможные причины снижения чувствительности: использование загрязнённой, недостаточно промытой посуды; нарушение правил использования и хранения вскрытых компонентов при дробном использовании набора; некорректная работа с пипетками; несоблюдение условий инкубирования; подсыхание лунок.
  - Некоторые возможные причины ложноположительных результатов: использование загрязнённой, недостаточно промытой посуды; плохая отмывка после инкубации с конъюгатом; длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации; некорректная работа с пипетками; непригодные для анализа образцы (см. раздел инструкции «Подготовка исследуемых образцов»).