

# Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления антител класса G к иерсинии "Иерсиния-G"

Тест-система представляет собой набор реагентов для выявления антител к возбудителям кишечного иерсиниоза (*Yersinia enterocolitica*) и псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) методом непрямого иммуноферментного анализа и включает в себя:

1. **Иммуносорбент** – рекомбинантный антиген, сорбированный в лунках планшета;
2. **Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т)**, 25х концентрат, – прозрачная, слегка опалесцирующая бесцветная жидкость;
3. **Раствор для предварительного разведения сывороток (РПР-С)** – прозрачная опалесцирующая жидкость **желто-бурого** цвета;
4. **Разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С)** – прозрачная опалесцирующая жидкость;
5. **Раствор конъюгата** (моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена) (**РКг**) – прозрачная опалесцирующая жидкость **зелёного** цвета;
6. **Положительный контрольный образец (К+)** – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к иерсинии - прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **красного** цвета;
7. **Отрицательный контрольный образец (К-)** - инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая антител к иерсинии – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **желтого** цвета;
8. **Хромоген** – тетраметилбензидин - субстрат (**ТМБ –субстрат**) – бесцветная или чуть желтоватого оттенка жидкость;
9. **Стоп-реагент** – прозрачная бесцветная жидкость.

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

## Назначение

Тест-система предназначена для выявления антител класса IgG к иерсинии в сыворотке (плазме) крови человека. Рекомендуется для анализа крови лиц с подозрением на заболевание кишечным иерсиниозом и псевдотуберкулезом.

## Способ применения

### Приготовление реагентов:

**ФСБ-Т** (при наличии во флаконе с концентратом ФСБ-Т осадка солей флакон выдержать при 37 °С до их полного растворения): содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл водой дистиллированной. Хранение: концентрат ФСБ-Т - в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С, раствор ФСБ-Т – 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
Объем, мл	Концентрат ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
	Вода дистил- лированная, 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

**РБР-С, РПР-С, РКг, ТМБ-субстрат** – готовы к использованию. В РБР-С возможно выпадение осадка. Перед использованием тщательно перемешать. Хранение: неиспользованные РБР-С, РПР-С, РКг, ТМБ-субстрат хранят в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

**К-, К+** - готовы к использованию. Хранение: после вскрытия флакона - до 48 ч при температуре от 20 до 25° С и в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

**Стоп-реагент** - готов к использованию. Хранение: не ограничено.

### Подготовка исследуемых сывороток

Возможно использование сыворотки (плазмы) крови человека как свежеприготовленной, так и хранившейся в течение 24 ч при температуре от 2 до 8° С или в течение трех месяцев при температуре минус 20 °С.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток.

Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки с погрешностью измерения объема не более 5 %.

**В лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл РПР-С, затем туда же внести по 10 мкл исследуемых сывороток с пипетированием 5 раз. Цвет РПР-С должен измениться.**

## Проведение анализа

Набор перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до 25° С.

1. **Планшет промыть один раз раствором ФСБ-Т**, при этом в каждую лунку планшета вносить от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить постукиванием планшета по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.
2. В любую одну лунку планшета внести **100 мкл К+**, в две другие лунки планшета - по **100 мкл К-**. При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- и К+ по одной лунке.
3. **В необходимое количество лунок** планшета внести по **100 мкл РБР-С**, затем туда же внести по **10 мкл предварительно разведенных сывороток** (см. Подготовка исследуемых сывороток) с пипетированием **5 раз**, при этом цвет РБР-С должен измениться. Планшет заклеить клейкой лентой и **инкубировать** в течение **30 мин при 37°С**.
4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и **промыть планшет пять раз** раствором ФСБ-Т, как в п. 1.
5. Внести по **100 мкл раствора конъюгата РКг**. Заклеить планшет и **инкубировать в течение 30 мин при 37° С**.
6. По окончании инкубации планшет **промыть ФСБ-Т пять раз**, как в п. 4.
7. Внести по **100 мкл ТМБ-субстрата**. Заклеить планшет и поместить на **15 мин в защищенное от света место при 37° С**.
8. Внести по **50 мкл стоп-реагента** для остановки реакции (соблюдать ту же последовательность добавления реагента, что и при внесении субстрата) 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 реакции считают корректной, если среднее значение оптической плотности в лунках с К- не более 0,2 оптических единиц (о.е.), а в лунке с К+ - не менее 1,0 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  $\pm$  10%) результат считается промежуточным. В этом случае необходимо повторить анализ и/или протестировать новую порцию сыворотки. При повторном попадании в “серую зону” результат считают положительным.

Результат анализа для большей информативности может быть представлен в виде индекса антител:

**индекс антител = ОП образца : ОПкрит**

<i>Индекс</i>	<i>Результат</i>
< 0,9	Отрицательный
0,9 – 1,1	Серая зона
> 1,1	Положительный

Образцы с индексом ниже 0,9 оцениваются как не содержащие антител к иерсинии..

Образцы с индексом более 1,1 оцениваются как содержащие антитела к иерсинии.

*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.*

## Форма выпуска

Тест-систему " Иерсиния-Г " выпускают в виде набора, упакованного в коробку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

Набор состоит из следующих компонентов: иммуносорбент, запаянный в пластиковый пакет, – 1 шт.; ФСБ-Т, 25х концентрат, по 26 мл - 1 флакон; РПР-С по 12 мл – 1 флакон; РБР-С по 12 мл - 1 флакон; РКг по 12 мл – 1 флакон; К+ по 1,5 мл – 1 флакон; К- по 2,5 мл - 1 флакон; ТМБ- субстрат по 12 мл – 1 флакон; стоп-реагент по 6 мл - 1 флакон.

## Срок годности, условия хранения и транспортирования

Срок годности набора 12 месяцев. Хранение при температуре от 2 до 8° С.

Транспортирование производить при температуре от 2 до 8° С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27° С в течение 5 дней. Не допускать замораживания.

## Краткая схема проведения ИФА «Иерсиния-С»

ВНИМАНИЕ! Прежде, чем пользоваться данной схемой, внимательно ознакомьтесь с инструкцией к тест-системе

	Наименование операции	Время и температура инкубации
1.	<u>Предварительное разведение образцов во вспомогательном планшете:</u> 90 мкл РПР-С + 10 мкл сыворотки. Пипетирование 5 раз	
2.	Промыть 1 раз однократным ФСБ-Т	
3.	Внести: 100 мкл К+ и К- 100 мкл РБР-С + 10 мкл предварительно разведенных образцов. Пипетирование 5 раз	30 мин при 37° С
4.	Промыть 5 раз однократным ФСБ-Т	
5.	Внести 100 мкл раствора конъюгата РКг	30 мин при 37° С
6.	Промыть 5 раз однократным ФСБ-Т	
7.	Внести 100 мкл ТМБ-субстрата	15 мин при 37° С
8.	Внести 50 мкл стоп-реагента	
9.	Измерить ОП при 450 нм	

### РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С ИФА ТЕСТ-СИСТЕМАМИ

#### Общие рекомендации

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;

все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).

Необходимо предъявлять высокие требования к чистоте лабораторной посуды, наконечников, ванночек и т.п., поскольку даже следы применяемых дезинфицирующих и моющих средств приводят к искажению результатов ИФА.

- Предпочтительно использование одноразовой посуды.
- При многократном использовании контейнера или ванночки для компонента их следует использовать всегда для одного и того же реагента, при повторном применении следует тщательно промыть дистиллированной водой до и после каждого использования.
- Для работы с набором следует использовать дистиллированную воду высокого качества, так как компоненты набора очень чувствительны к микробиологическому загрязнению, хлорноватистой кислоте и ароматическим хлорсоединениям, ионам металлов, зачастую находящихся в воде.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий.
- При использовании автоматического вошера или гребёнки ёмкость и шланги для промывочного раствора рекомендуется 1 раз в неделю обрабатывать 70%-ным спиртом с последующей отмывкой дистиллированной водой.

#### Требования к анализируемым образцам

- Для проведения ИФА не рекомендуется использовать гемолизированные, гиперлипидные или повторно замороженные сыворотки.
- Допускается хранение образцов сывороток при 2-8°С в течение 48 часов, либо при температуре минус 20°С в течение 3 месяцев.
- После размораживания образцы тщательно перемешать.
- При необходимости образцы очистить центрифугированием при 5-10 тыс.об/мин.

#### Возможные причины снижения чувствительности

- Уменьшение времени инкубации (как правило, субстратной реакции).
- Использование загрязнённой посуды и наконечников.
- Замачивание посуды и наконечников в перекиси водорода или хлорсодержащих растворах без последующего кипячения в процессе мытья.
- Плохая отмывка после инкубации сывороток.
- Растворы, не нагретые перед постановкой до комнатной температуры.
- Размещение планшет в термостате стопкой.
- Низкая температура в лабораторных комнатах (ниже +18°С).
- Нарушение правил и сроков хранения вскрытых компонентов при дробном использовании набора.

#### Возможные причины ложноположительных результатов

- Плохая отмывка на стадии конъюгата.
- Длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации.
- Контаминированный вошер, гребёнка или низкого качества дистиллированная вода.
- Неправильная работа с пипетками.
- Многократное использование наконечников и посуды для ТМБ-субстрата.
- Нерастворённые кристаллы в концентрате отмывающего раствора.
- Сыворотки с бактериальным проростом или с наличием клеточных элементов.