

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2009 г. № _____ -Пр/09

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО «Омникс»

В. В. Андрейчук

«__» _____



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
тест-системы иммуноферментной для выявления
антител класса М и G к возбудителям иерсиниозов
«Иерсиниоз-ИФА-IgM/ Иерсиниоз-ИФА-IgG»**

Настоящая инструкция по применению распространяется на набор реагентов «Иерсиниоз-ИФА-IgM/Иерсиниоз-ИФА-IgG», (далее по тексту – набор), представляющий собой два комплекта для выявления антител класса М (Комплект «Иерсиниоз-ИФА-IgM») и G (Комплект «Иерсиниоз-ИФА-IgG») к возбудителям иерсиниозов в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Каждый комплект набора рассчитан на одновременное проведение 48 определений с постановкой в дублях включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов предназначен для выявления антител класса М и G соответственно к возбудителям иерсиниозов в сыворотке (плазме) крови человека.

СОСТАВ НАБОРА

- Иммуносорбент - 96-луночный полистироловые или полихлорвиниловые разборные планшеты для иммунологических реакций, в лунках которых сорбирована смесь рекомбинантных антигенов (белков) иерсиний - 1 шт;
- «К+» - положительный контрольный образец - сыворотка крови человека, в разведении 1:100, инактивированная, содержащая антитела класса М и G к антигенам иерсиний, не содержащая HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к гепатиту С, к *Treponema pallidum.*, прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость; - 1 флакон (1,2мл);
- «К-» - отрицательный контрольный образец - сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая антител к антигенам иерсиний, не содержащая HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к гепатиту С, к *Treponema pallidum.*, инактивированная, прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость зеленого цвета – 2флакона (по 1,2 мл);

примечание: Все образцы сывороток крови человека входящие в состав К+ и К- тестированы на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1, антител к гепатиту С, антител к HBsAg тест-системами, зарегистрированными на территории РФ.

- БИС- буфер для инкубации сывороток, прозрачная жидкость синего цвета – 1 флакон (10,0 мл);
- БРС – буфер для разведения сывороток, прозрачная жидкость красного цвета – 1 флакон (10,0 мл);
- ФСБ-Т (концентрат x20)- прозрачная слегка опалесцирующая пенящаяся жидкость, допускается выпадение кристаллического осадка белого цвета, растворяющегося при температуре (37±1) °С в течение 30 мин – 2 флакона (по 20,0 мл);

- РК, IgM – раствор конъюгата для комплекта «Иерсиниоз-ИФА-IgM» – моноклональные мышинные антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная желтого цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном встряхивании – 1 флакон (12,0 мл);
- РК, IgG – раствор конъюгата для комплекта «Иерсиниоз-ИФА-IgG» – моноклональные мышинные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная желтого цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном встряхивании – 1 флакон (12,0 мл);
- ЦФБ – цитратно-фосфатный буфер, прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (7,0 мл);
- ТМБ - хромоген – 3', 5, 5' - тетраметилбензидин (ТМБ), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость – 1 флакон (7,0 мл);
- Стоп-реагент (2N раствор соляной кислоты), прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон (12,0 мл);

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все компоненты набора, за исключением стоп реагента, в состав которого входит соляная кислота, в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Стоп-реагент, содержащий соляную кислоту, действует на кожу и слизистые, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы ее следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пласти-

ковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов и другие возбудители вирусных и других гемотрансмиссивных инфекций.

При утилизации контрольных сывороток и тестируемых образцов необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- автоматический промыватель планшетов;
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру $+37^{\circ}\text{C}$, или планшетный шейкер-термостат на температуру $+37^{\circ}\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными;
 - наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными;
 - наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-300 мкл;
- ванночки для реагентов;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека, подготовленные стандартным образом.

ВНИМАНИЕ!

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо сохранять в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Отобранные образцы сывороток хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 72 час, для более длительного хранения их замораживают и хранят при минус 18 °С и ниже, избегая многократного замораживания-оттаивания. Пробы, содержащие агрегаты или осадок, осветляют центрифугированием. Каждый образец отбирается индивидуальным наконечником. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

При проведении анализа нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление рабочих растворов.

К+ - положительный контрольный образец, К- - отрицательный контрольный образец, БИС, БРС; РК, IgM и РК, IgG (растворы конъюгатов) - *готовы к использованию.*

Хранение: после вскрытия флакона К+, К-, РК, IgM и РК, IgG хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца.

- ФСБ-Т (концентрат x20) – раствор для отмывания планшетов.

Содержимое одного флакона концентрата ФСБ-Т перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 400 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе с концентратом ФСБ-Т осадка солей, необходимо предварительно подогреть его при температуре (37±1) °С до полного их растворения.

Хранение: рабочий раствор ФСБ-Т - не более 1 мес при температуре от 2 °С до 8 °С.

- Приготовление рабочего раствора субстрата.

Раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием в отдельной чистой емкости. Из флакона с ЦФБ необходимо отобрать

6,0 мл раствора и смешать с 6,0 мл ТМБ. Раствор тщательно перемешать. При использовании 1 стрипа в 0,5 мл. ЦФБ добавить 0,5 мл.ТМБ.

Хранение: до 10 мин при температуре 20 -25 °С в защищенном от света месте.

Предварительное разведение исследуемых сывороток.

Образцы исследуемых сывороток разводят 1:10 в БРС. Для этого смешивают 10 мкл каждой сыворотки с 90 мкл. БРС.

Хранение: разведенные образцы исследуемых сывороток хранению не подлежат.

ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА.

Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при комнатной температуре (20 – 25 °С) не менее 30 мин.

Установить в рамке планшета необходимое количество стрипов.

Неиспользованные стрипы хранить только в герметично закрытом пакете при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 мес. с момента вскрытия целлофанового пакета.

В лунку планшета А1 вносят 100 мкл БИС и используют как бланк. В лунку В1 вносят (К+) 100 мкл, в лунки С1 и D1 вносят (К-) по 100 мкл. Лунку Е1 - контроль конъюгата. В остальные лунки вносят по 90 мкл БРС и по 10 мкл ***предварительно разведенных*** исследуемых сывороток. Окончательное рабочее разведение сывороток 1:100.

После этого планшет следует заклеить клейкой лентой и инкубировать 30 мин при (37±1) °С на термошейкере при скорости встряхивания платформы 500 об/мин или 1 ч. в термостате при температуре (37±1) °С.

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза следующим образом:

- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- в каждую лунку внести по 300 мкл промывочного буфера, перемешать в течение 10 сек на шейкере;
- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- тщательно удалить остатки влаги из планшета, аккуратно постукивая перевёрнутым планшетом по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько слоёв.

После промывки и удаления влаги в каждую лунку внести рабочий раствор конъюгата РК, IgM (комплект «Иерсиниоз-ИФА-IgM») или РК, IgG (комплект «Иерсиниоз-ИФА-IgG») объемом по 100 мкл. Планшет закрыть, как описано выше, и инкубировать 30 мин при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на шейкере при скорости встряхивания платформы 500 об/мин или в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ без встряхивания.

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза и удалить остатки влаги из планшета, аккуратно постукивая перевёрнутым планшетом по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько слоёв.

Внести в каждую лунку планшета рабочий раствор субстрата объемом по 100 мкл, приготовленного как указано выше. Планшет инкубировать 10 мин при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на шейкере при скорости встряхивания платформы 500 об/мин или в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ без встряхивания. Реакцию остановить внесением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и немедленно произвести учет результатов.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Учет результатов проводят спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Нулевой уровень (бланк) устанавливают по воздуху.

Результаты учитывают только в том случае, если :

- значение ОП в лунках с бланком и контролем конъюгата (Оп бланк, ОПкк) не превышает 0,15, каждый;
- в лунках с (К-) среднее значение ОП (ОП К_{ср-}) не более 0,2;
- в лунках с (К+) значение ОП (ОП К₊) не менее 0,8.

ОПкрит рассчитывают по формуле: $\text{ОПкрит} = \text{ОПК}_{\text{ср-}} + 0,2$

Коэффициент серопозитивности (КС) образца рассчитывают по формуле:

$$КС = \frac{ОП \text{ исследуемой сыворотки}}{ОП_{крит}}$$

Интерпретация результатов:

1.	КС образца < 0,9	Отрицательный результат. Указывает, что тестируемый образец либо не содержит антител класса М/Г к возбудителям иерсиниозов, либо содержит не детектируемый уровень антител.
2.	0,9 < КС образца < 1,1	Сомнительный результат «серая зона». Повторить анализ. Если повторное исследование выявило сомнительный результат, рекомендуется провести дополнительное исследование нового образца сыворотки через 4-6 недель.
3.	КС образца > 1,1	Положительный результат. Указывает, что тестируемый образец содержит антитела класса М/Г к возбудителям иерсиниозов.

Полуколичественная оценка результатов анализа.

Для оценки динамики развития иммунного ответа рекомендуется сравнивать значения КС сывороток пациента, собранных с интервалом 1-2 недели. В таблице указан ориентировочный титр сыворотки, соответствующий полученному значению КС.

Диапазон КС для IgM/IgG	Титр сыворотки
1.1 – 1.5	1:100
1.5 – 2.0	1:200
2.0 – 3.0	1:400
3.0 – 4.5	1:800
4.5 – 6.5	1:1600
6.5 – 9.0	1:3200
> 9.0	1:6400

Рекомендуется соотносить данные серологического анализа с результатами других диагностических обследований, а также с клинической картиной заболевания и на основании комплексных клинико-лабораторных исследований ставить окончательный диагноз.

СРОК ГОДНОСТИ.

Срок годности набора – 12 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

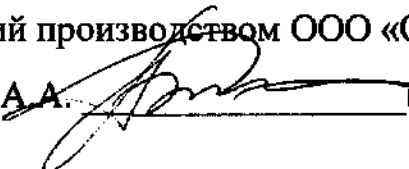
УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Транспортирование наборов должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С не более 5 сут. Замораживание не допускается. На дальние расстояния транспортирование авиатранспортом.

Набор должен храниться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Хранить в недоступном для детей месте.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов «Иерсиниоз-ИФА-IgM/Иерсиниоз-ИФА-IgG» следует обращаться на предприятие-изготовитель в ООО «Омникс» по адресу: 194044, г.Санкт-Петербург, Б.Сампсониевский пр.,11А Тел./Факс: (812) 542-0101, 972-5204 Эл. почта: omnix.sales@gmail.com и в ФГУН ГИСК им Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д 41 , тел. (495) 241-39-22.

Заведующий производством ООО «Омникс»

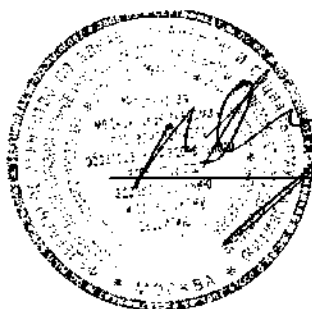
Козаренко А.А.  (Подпись)

«СОГЛАСОВАНО»

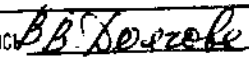
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

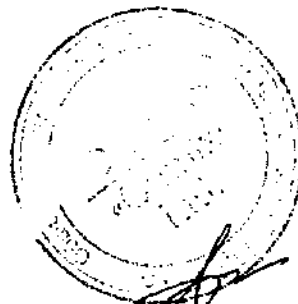
« ____ » _____ 2009 г



д.м.н., проф. В.В.Долгов

Подпись	
удостоверяю: специалист по	
кадровой работе ГОУ ДПО	
РМАПО Росздрава	
Подпись	

Принято и проин-
формировано 9 (декаб) 2016 г.



ген. директор
ООО "Цирми"

Андреев И. В.