



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G
к возбудителям иерсиниозов

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 22.08.2013

Приказом Росздравнадзора № 4301-Пр/13

НАБОР РЕАГЕНТОВ

D-3202

Иерсиния – IgG – ИФА – БЕСТ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Иерсиния-IgG-ИФА-БЕСТ» предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к патогенным иерсиниям (*Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Набор реагентов «Иерсиния-IgG-ИФА-БЕСТ» представляет собой набор реагентов, основой которого является смесь рекомбинантных антигенов иерсиний, сорбированных на поверхности лунок разборного полистиролового планшета.

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотке/плазме крови человека иммуноглобулины класса G к *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* за счёт их взаимодействия с иммобилизованными антигенами (АГ). АГ представляют собой рекомбинантные белки внешней мембраны иерсиний (YOPs). Данные АГ высокоспецифичны

для *Yersinia*, не обнаружены ни у каких других бактерий и характерны только для штаммов *Yersinia*, патогенных для человека. Образование комплекса антиген-антитело выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Во время инкубации с раствором тетраметилбензида происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело». Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя **оптическую плотность (ОП)** в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. После измерения ОП в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит.}$ результат для каждого анализируемого образца оценивается как положительный или отрицательный.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованными антигенами иерсиний – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат (*антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена*) – 1 фл. или 2 фл.;

- раствор для разведения сывороток (РС) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 3 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнками для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к возбудителям иерсиниозов должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-438), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», включающей образцы, содержащие иммуноглобулины класса G к возбудителям иерсиниозов: **чувствительность** по IgG к возбудителю иерсиний – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к возбудителям иерсиниозов должен соответствовать

требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-438), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», включающей образцы, не содержащие иммуноглобулины класса G к возбудителям иерсиниозов: **специфичность** по IgG к возбудителю иерсиний – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

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 дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения ОП растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;

- термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- термошейкер, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С, интенсивность перемешивания 400–800 об/мин;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру $(2-8)$ °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (*погрешность не более 5%*);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (*погрешность не более 5%*);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 4) °С, если необходимо более длительное хранение.
- Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10–15 минут.
- Нельзя использовать проросшие, гемолизованные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. ВНИМАНИЕ! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.
- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.

- Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 минут до их использования.
- После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) °С.
- Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.
- Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.
- При промывке лунки (*стрипа, планшета*) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

- Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (*ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор ТМБ*), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».
- Наконечники для пипеток (*автоматических дозаторов*) следует использовать однократно.
- Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.
- Посуду (*ванночки*), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования посуду (*ванночки*) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (*ванночки*) для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.
- Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и кон-

трольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов (*МУ-231-113-00 от 29.10.98*).

- Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (*см. таблицу*) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до **700** мл.

Хранение: при температуре (2–8)°С до 5 суток.

Таблица расхода реагентов

Количество используемых стрипов												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Конъюгат (концентрат), мкл	α^*	2×а	3×а	4×а	5×а	6×а	7×а	8×а	9×а	10×а	11×а	12×а
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ												
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = ▲▲▲ МКЛ (значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).

7.2.2. Растворы конъюгата.

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать **одноразовые** наконечники для пипеток.

7.2.2.1. Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 3 месяцев при (2–8) °С или до 12 месяцев при минус (20±4) °С. Допускается 3-кратное замораживание концентрированного раствора конъюгата.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

7.2.2.2. Тщательно взболтать содержимое флакона с РК. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.2.3. Раствор ТМБ.

Внимание! Раствор ТМБ готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать **только** для работы с раствором ТМБ.

Непосредственно перед использованием отобрать в пластиковую ванночку только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ (см. таблицу). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Хранение: при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.2.1).

7.3.2. Во все лунки стрипов внести по **90 мкл РС**. В одну лунку внести **10 мкл K^+** , в 2 другие лунки – по **10 мкл K^-** . Во все остальные лунки стрипов внести по **10 мкл исследуемых образцов**. При этом цвет раствора в лунках изменится на синий.

Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать при $(37 \pm 1)^\circ C$ в термошейкере при 500 об/мин **30 минут**.

За 5 минут до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.2.2).

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (**400 мкл рабочего промывочного раствора**). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.4. Внести во все лунки по **100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении**.

***Внимание!** Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать при температуре (37 ± 1) °C **30 минут**.

7.3.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.3.6. Внести в каждую лунку по **100 мкл раствора ТМБ (п. 7.2.3)**.

***Внимание!** Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.*

Стрипы поместить в защищённое от света место при температуре $(18-25)$ °C на **25 минут**.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в лунки по **100 мкл стоп-реагента** и через 2–3 минуты измерить ОП.

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя ОП в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с K^- не более 0,2 ($ОП_{ср}K^- \leq 0,2$).
- значение ОП в лунке с K^+ не менее 0,8 ($ОПК^+ \geq 0,8$);

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,25,$$

где $ОП_{ср}(K^-)$ – среднее арифметическое значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом.

Если $ОП_{ср}(K^-)$ имеет отрицательное значение, считать её равной нулю.

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (КП):

$$КП = ОП_{иссл. сыв.} / ОП_{крит.}$$

При $КП < 1,0$ результат расценивать как отрицательный.

$КП \geq 1,0$ – результат положительный.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора;
- контрольные образцы, ФСБ-Т×25, РС, РК, РПР, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора;
- концентрированный раствор конъюгата можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение 3 месяцев с момента приготовления или при температуре

- минус (20 ± 4) °С до конца срока годности набора;
- промывочный раствор можно хранить при температуре $(2-8)$ °С до 5 суток с момента приготовления.

По вопросам, касающимся качества набора «Иерсиния-IgG-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;

тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-68-23.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;

- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (*потребительские свойства*)

которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Набор «Иерсиния – IgG – ИФА – БЕСТ» рекомендуется для:

- диагностики иерсиниозов;
- наблюдения в процессе лечения и последующей диспансеризации;
- проведения эпидемиологического обследования населения;
- обследования контактных лиц.

Согласно литературным данным **антитела (АТ) класса G к *Yersinia*** встречаются у 10–40% населения, АТ класса А – до 11%, АТ класса М – до 2%. Эти цифры отражают распространенность иерсиниозов среди взрослого населения.

Для правильной интерпретации результатов, разграничения острой, недавно перенесённой, давно перенесённой инфекции, прогнозирования исхода заболевания (*выздоровление или хронизация процесса*) и последующего выбора тактики лечения важно включать в исследование определение IgA, IgG и IgM.

После перенесённой инфекции IgG могут циркулировать в крови несколько месяцев или лет.

Иммуноглобулины классов А и М при благоприятном исходе иерсиниозов исчезают из сыворотки крови в течении 2–6 месяцев. Сохранение в крови IgA и/или IgM более 6-ти месяцев свидетельствует о хроническом течении заболевания и персистенции возбудителя.

Увеличение или уменьшение КП в динамике свидетельствует о нарастании или снижении, соответственно, титра АТ.

Достоверным считать изменение КП в 2 раза и более.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменения концентрации иммуноглобулинов класса G к иерсиниям в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (*одного предприятия-изготовителя*).

Рекомендуется исследовать парные сыворотки с интервалом 3–4 недели.

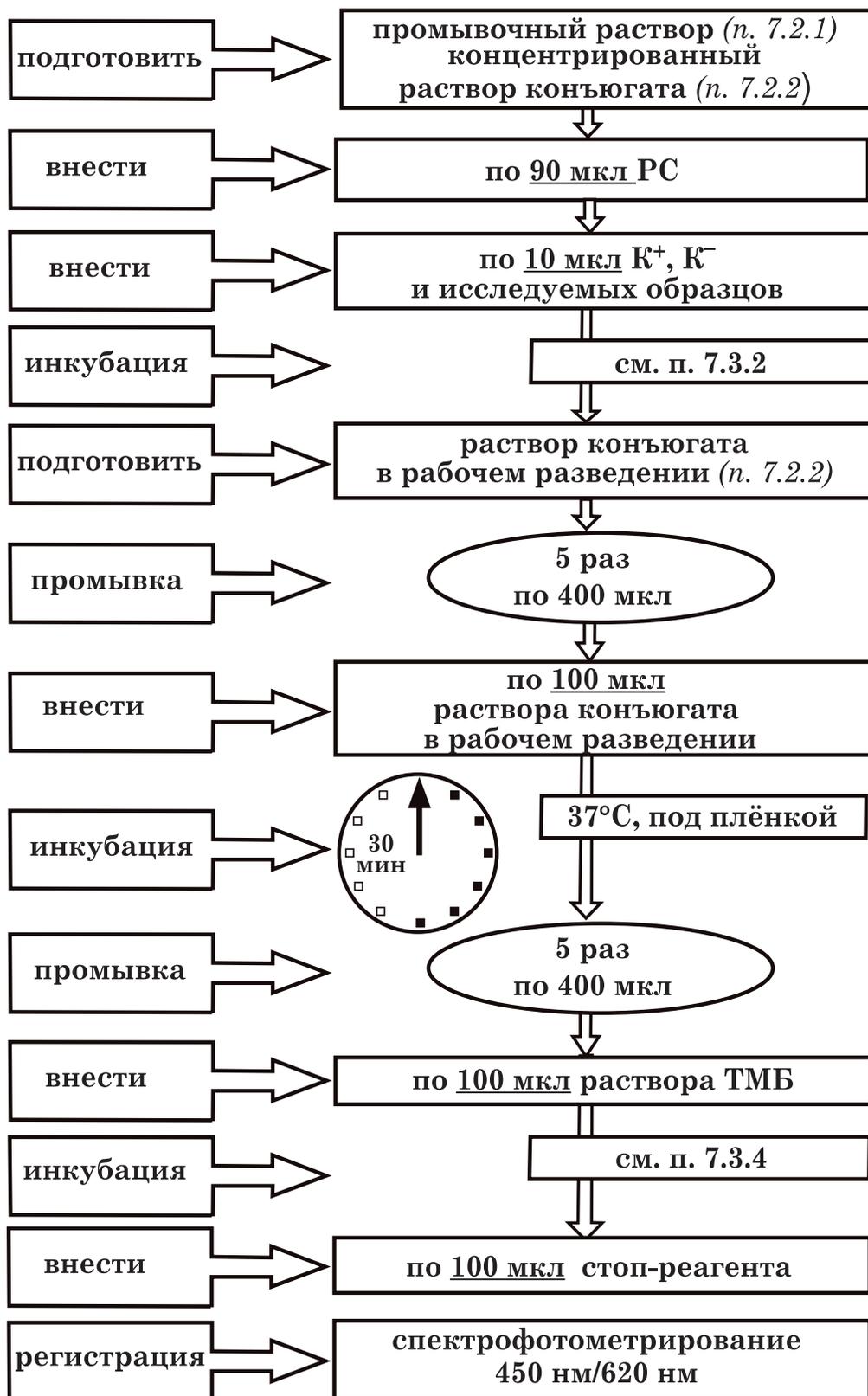
При интерпретации результатов можно руководствоваться приведённой ниже таблицей:

IgG	IgM	IgA	Интерпретация
+	—	—	перенесённая в прошлом инфекция
+	+, но КП снижается в течении 3–6 мес.	+, но КП снижается в течении 3–6 мес.	недавно перенесённая инфекция с исходом в выздоровление
+ или —	— или +, но КП снижается в динамике	+ более 6 мес.	персистенция возбудителя. Артриты, узловатая эритема, миокардиты и др. осложнения инфекционно- аллергического характера
+ или —	+ более 6 мес.	+ или —	хронические илеиты, тифлиты, колиты и др.

При обследовании больного с подозрением на иерсиниозную инфекцию представляется важным тесное сотрудничество между лечащим врачом и врачом-лаборантом, особенно если получены слабоположительные результаты при тестировании.

Окончательный диагноз формулируется на основании клинико-анамнестических данных, эпиданамнеза и результатов комплекса лабораторных исследований.

Схема анализа D-3202



ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

26.02.16

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Международный сертификат
ISO 13485

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru