

**1. Назначение**

Настоящая инструкция по применению распространяется на медицинский иммунобиологический препарат Комплект № 2 «Боррелиоз ИФА- IgG» – тест-систему иммуноферментную, представляющую собой набор реагентов для выявления антител класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (болезнь Лайма) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Комплект набора рассчитан на одновременное исследование 96 образцов, включая контроли.

**Таблица 1. Состав набора**

Маркировка	Компонент	Статус	Цвет раствора	Фасовка
Иммуно-сорбент	Иммуносорбент - микропланшет с сорбированной в лунках смесью антигенов	Готов к использованию	-----	12x8
К+	«К+» - положительный контрольный образец	Готов к использованию	красный	1x 1,2 мл
К-	«К-» - отрицательный контрольный образец	Готов к использованию	зеленый	2x 1,2 мл
БРС	Буфер для разведения сывороток	Готов к использованию	красный	1x 10,0 мл
БИС	Буфер для инкубации сывороток	Готов к использованию	синий	1 x 10,0 мл
ФСБ-Т	20 x концентрат фосфатного солевого буфера с твином	<b>Требуется подготовки</b>	бесцветный	2 x 20,0 мл
РК IgG	Раствор конъюгата с пероксидазой хрена.	Готов к использованию	желтый	1 x 12,0 мл
ТМБ	Раствор хромогена (3, 3', 5, 5' – тетраметилбензидина)	<b>Требуется подготовки</b>	бесцветный	1 x 7,0 мл
ЦФБ	Цитрат-фосфатный буфер	<b>Требуется подготовки</b>	бесцветный	1 x 7,0 мл
Стоп-реагент	2н раствор соляной кислоты	Готов к использованию	бесцветный	1 x 12,0 мл
----	Пленка для инкубации планшетов	----	----	1 шт.
Емкости для жидких компонентов	Емкости для жидких компонентов	----	----	2 шт.
----	Инструкция по применению	----	----	1 шт.

**2. Состав набора (подробный)**

- «Иммуносорбент» – 96-луночный разборный планшет для иммунологических реакций, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов боррелий. Готов к использованию – 1 шт.

- «K+» – положительный контрольный образец - сыворотка крови человека в разведении 1:100, содержащая антитела класса G к антигенам боррелий, инактивированная, прозрачная жидкость красного цвета, допускается опалесценция. Готов к использованию - 1 флакон (1,2мл).
- «K-» – отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая антител к антигенам боррелий, инактивированная, прозрачная жидкость зеленого цвета, допускается опалесценция. Готов к использованию – 2 флакона (по 1,2 мл).  
Примечание: Все образцы сывороток крови человека входящие в состав «K+» и «K-» тестированы на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигена р24 ВИЧ-1, антител к гепатиту С, антител к HBsAg тест-системами, сертифицированными и разрешенными к применению на территории РФ.
- «БРС» – буфер для разведения сывороток, прозрачная жидкость красного цвета. Готов к использованию – 1 флакон (10,0 мл).
- «БИС» – буфер для инкубации сывороток, прозрачная жидкость синего цвета. Готов к использованию – 1 флакон (10,0 мл).
- «ФСБ-Т» (20 x концентрат) – прозрачная пенящаяся жидкость; допускается опалесценция и выпадение кристаллического осадка белого цвета, растворяющегося при температуре +37°C в течение 30 мин; требует предварительного разведения (см. Приготовление реагентов) – 2 флакона (по 20,0 мл).
- «РК» – раствор конъюгата, моноклональные мышиные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, прозрачная жидкость желтого цвета. Готов к использованию – 1 флакон (12,0 мл).
- «ТМБ» – 3, 3', 5, 5' - тетраметилбензидин (ТМБ), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость; требует подготовки – 1 флакон (7,0 мл).
- «ЦФБ» – цитрат-фосфатный буфер, прозрачная, бесцветная жидкость; требует подготовки – 1 флакон (7,0 мл).
- «Стоп-реагент» (2N соляная кислота) – прозрачная бесцветная жидкость. Готов к использованию – 1 флакон (12,0 мл).

### **3.Меры предосторожности**

Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

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 его следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

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

Работая с набором, следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые 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 официально утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.

#### **4.Оборудование, реагенты и материалы**

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм, 620 нм.
- Автоматический промыватель планшетов (вошер).
- Термостат суховоздушный или планшетный шейкер, обеспечивающие температуру +37°C.
- Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл.
- Пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-300 мкл.
- Таймер.
- Бумага фильтровальная.
- Перчатки резиновые.
- Мерные емкости (0,5 л).
- Дистиллированная вода.
- Этиловый спирт, хлорамин или перекись водорода для дезинфекции.

#### **5.Анализируемые образцы**

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

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы сывороток хранить при температуре от +2 °С до +8 °С не более 10 суток. При необходимости возможно длительное хранение при температуре минус 20°С. Следует избегать многократного замораживания-оттаивания. После размораживания пробы тщательно перемешивают, осадок отделяют центрифугированием. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

**Внимание! В рамках одного анализа запрещается использовать реагенты из наборов разных серий выпуска, наименований и производителей!**

#### **6.Проведение иммуноферментного анализа**

##### ***Подготовка к анализу***

Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при комнатной температуре (+18 ...+25 °С) 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 пакета*

*«Иммуносорбент».*

##### ***Приготовление реагентов***

###### ***Рабочий раствор ФСБ-Т***

Содержимое флакона «ФСБ-Т» (20мл) перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 400 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе «ФСБ-Т» осадка солей необходимо предварительно прогреть его при температуре (+37±1) °С до полного растворения осадка.

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

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.

Рабочий раствор субстрата

Готовится непосредственно перед использованием! В расчете на 1 стрип: 0,5 мл раствора «ЦФБ» смешать с 0,5 мл «ГМБ». Тщательно перемешать. Хранить не более 10 минут при температуре +20-25° С в защищенном от света месте.

**Внесение образцов, контролей**

Образцы и контроли вносятся согласно схеме (таб. 2).

В лунки вносятся: А1 (контроль конъюгата) – 100мкл «БИС»; В1 (положительный контрольный образец) – 100мкл «К+»; С1, D1 (отрицательный контрольный образец) по 100мкл «К-». Начиная с лунки Е1 последовательно вносятся исследуемые образцы.

**Таблица 2. Схема внесения образцов и контролей:**

Стрипы	1			-----	12		
	Лунка	Образец мкл	«БИС» мкл		Лунка	Образец мкл	«БИС» мкл
<b>А</b>	Контроль конъюгата	---	100		-----	-----	-----
<b>В</b>	К+	100	-----		-----	-----	-----
<b>С</b>	К-	100	-----		-----	-----	-----
<b>Д</b>	К-	100	-----		-----	-----	-----
<b>Е</b>	Образец 1	10	90		Образец 45	10	90
<b>Ф</b>	Образец 1	10	90		Образец 45	10	90
<b>Г</b>	Образец 2	10	90		Образец 46	10	90
<b>Н</b>	Образец 2	10	90		Образец 46	10	90

Дублирование образцов позволяет увеличить достоверность получаемых результатов!

**Инкубация образцов (1 этап)**

После внесения образцов планшет следует заклеить клейкой лентой и инкубировать 30 мин при (+37±1) °С на термошейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или 1 час в термостате при температуре (+37±1) °С.

**Промывка**

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, инкубировать в течение 10 сек;
- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;

- тщательно удалить остатки влаги из планшета постукиванием перевернутой рамки по фильтровальной бумаге.

**Инкубация конъюгата (2 этап)**

После промывки и удаления остатков промывочного раствора в каждую лунку внести по 100 мкл «РК». Планшет закрыть плёнкой (как описано выше) и инкубировать 30 мин при  $(+37\pm 1)$  °С на шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или в термостате при температуре  $(+37\pm 1)$  °С.

**Промывка**

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза по 300мкл (как описано выше).

**Инкубация с хромогеном (3 этап)**

Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора хромогена. Планшет инкубировать 10 мин при  $(+37\pm 1)$  °С на шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или в термостате при температуре  $(+37\pm 1)$  °С.

**Остановка реакции (4 этап)**

Реакцию остановить внесением в каждую лунку по 100 мкл Стоп-реагента. Убедиться в полном изменении окраски.

**Таблица 3. Краткая схема ИФА**

(использовать только после ознакомления с полной инструкцией!)

<b>Внесение образцов</b>	<b>См. таблицу 2</b>		
<b>Инкубация</b>	<b>30 мин.</b>	<b>+37°С</b>	<b>Шейкер 500 об/мин</b>
<b>Промывка</b>	<b>3 раз по 300 мкл ФСБ-Т</b>		
<b>Внесение РК</b>	<b>100 мкл</b>		
<b>Инкубация</b>	<b>30 мин</b>	<b>+37°С</b>	<b>Шейкер 500 об/мин</b>
<b>Промывка</b>	<b>3 раз по 300 мкл ФСБ-Т</b>		
<b>Внесение рабочего раствора хромогена</b>	<b>100 мкл</b>		
<b>Инкубация</b>	<b>10 мин</b>	<b>+37°С</b>	<b>Шейкер 500 об/мин</b>
<b>Остановка реакции</b>	<b>100 мкл «Стоп-реагент»</b>		
<b>Измерение ОП</b>	<b>450 нм/620нм</b>		

**7. Учет результатов**

Измерение проводят спектрофотометрически при длине волны 450 нм немедленно после внесения Стоп-реагента. Значение референсной длины волны - 620 нм. Нулевой уровень (бланк) устанавливается по воздуху.

Результаты учитывают только в том случае, если:

- в лунке А1 (контроль конъюгата) ОП  $\leq 0,15$ ;
- в лунках с «К-» среднее значение ОП  $\leq 0,2$ ;
- в лунке с «К+» значение ОП  $\geq 0,8$ .

Коэффициент серопозитивности (КС) сыворотки рассчитывают по формуле:

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

Где: ОП<sub>крит.</sub> = ОП К- ср + 0,2

Значения ОП контрольного отрицательного образца не должны отличаться от ОП К-ср более чем на 20%. В противном случае необходимо повторить исследование.

**Таблица 4. Качественная интерпретация результатов**

КС образца < 0,9	Отрицательный результат. Тестируемый образец либо не содержит иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов, либо содержит не детектируемый уровень IgG.
0,9 ≤ КС образца ≤ 1,1	Сомнительный результат - «серая зона». Повторить анализ. Если повторное исследование показало сомнительный результат, рекомендуется провести дополнительное исследование нового образца сыворотки через 4-6 недель.
КС образца > 1,1	Положительный результат. Тестируемый образец содержит иммуноглобулины класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов. Величина КС отражает относительную концентрацию специфических иммуноглобулинов.

**Полуколичественная интерпретация результатов :**

Для оценки динамики иммунного ответа рекомендуется сравнить значения КС сывороток пациента, собранных с интервалом 1-2 недели.

**Таблица 5. Ориентировочный титр сыворотки, соответствующий полученному значению**

<b>Диапазон КС для IgG</b>	<b>Ориентировочный титр сыворотки</b>
1.1-1.5	1:100
1.5-3.0	1:200
3.0-4.5	1:400
4.5-6.5	1:800
6.5-9.0	1:1600
>9.0	1:3200

**8. Условия транспортировки и хранения, срок годности**

Транспортировка наборов реагентов должна 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 7 сут. Замораживание не допускается.

Набор реагентов 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.

Срок годности набора – 9 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.