

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	Требуется подготовки	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)	Требуется подготовки	бесцветный	1 x 7,0 мл
ЦФБ	Цитрат-фосфатный буфер	Требуется подготовки	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	----	----	1шт.
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 мышинные 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, противоэпидемического 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
А	Контроль конъюгата	---	100		-----	-----	-----
В	К+	100	-----		-----	-----	-----
С	К-	100	-----		-----	-----	-----
Д	К-	100	-----		-----	-----	-----
Е	Образец 1	10	90		Образец 45	10	90
Ф	Образец 1	10	90		Образец 45	10	90
Г	Образец 2	10	90		Образец 46	10	90
Н	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!)

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

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_{крит.} = 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.
$0,9 \leq \text{КС образца} \leq 1,1$	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

Диапазон КС для IgG	Ориентировочный титр сыворотки
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.