

Тест-система
иммуноферментная
для выявления
антител класса G
к возбудителям
иксодовых клещевых
боррелиозов
(болезнь Лайма).

ООО «Омникс»

KS-002 Боррелиоз-ИФА-IgG

1. Назначение

Настоящая инструкция распространяется на медицинский иммунобиологический препарат «Боррелиоз-ИФА-IgG» — тест-систему иммуноферментную для выявления антител класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (болезнь Лайма), состоящую из многокомпонентного набора реагентов для постановки непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

Один набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контроли.

В наборе используется композиция рекомбинантных белков боррелий, сорбированных на поверхности стрипов.

Тест-система позволяет качественно и полуколичественно интерпретировать результаты, предназначена для эпидемиологических и клинических исследований, мониторинга терапии заболевания.

2. Состав набора

- «БРС»: буфер для разведения сывороток, прозрачная жидкость красного цвета (1 фл×10 мл);
- «БИС»: буфер для инкубации сывороток, прозрачная жидкость синего цвета (1 фл×10 мл);
- «РК»: раствор конъюгата, моноклональные мышиные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, прозрачная жидкость желтого цвета (1 фл×12 мл);
- «ЦФБ»: цитрат-фосфатный буфер, прозрачная, бесцветная жидкость (1 фл×7 мл);
- «ТМБ»: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость (1 фл×7 мл);
- «Стоп-реагент»: 2N раствор соляной кислоты, прозрачная бесцветная жидкость (1 фл×12 мл);
- «К+»: положительный контрольный образец, сыворотка крови человека в разведении 1:100, содержащая антитела класса G к антигенам боррелий, инактивированная, прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, красного цвета (1 фл×1,2 мл);
- «К-»: отрицательный контрольный образец, сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая антител к антигенам боррелий, инактивированная, прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, зеленого цвета (2 фл×1,2 мл);
- «ФСБ-Т»: 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с твином, прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость (2 фл×20 мл);
- «иммуносорбент»: полистироловый или полихлорвиниловый 96-луночный разборный планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов.

3. Способ применения

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови.

Внимание!

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального роста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащих осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не допускается тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым накопником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять пипетки с погрешностью измерения объема не более 5%.

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

Тест-система является полностью биологически безопасной, т.к. содержит рекомбинантные антигены и инактивированные контрольные сыворотки. При анализе клинических образцов с тест-системой следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: не пипетировать растворы ртом; работать в резиновых перчатках; все использованные материалы подвергать об-

работке раствором 70% этилового спирта или 6% раствором перекиси водорода с последующей выдержкой при температуре 20-25°C не менее 2 часов.

При попадании на кожу или слизистые оболочки содержимого флаконов «ТМБ» или «Стоп-реагент» немедленно промыть пораженные участки большим количеством воды.

Для проведения анализа дополнительно требуются следующие материалы:

- дистиллированная вода;
- этиловый спирт, хлорамин или перекись водорода для дезинфекции;
- резиновые перчатки;
- фильтровальная бумага.

4. Приготовление реагентов

4.1. Приготовление рабочего раствора «ФСБ-Т» для промывки планшета.

Содержимое одного флакона «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 подогреть его при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ до полного растворения. Хранение: рабочий раствор «ФСБ-Т» хранят при температуре от $+2$ до $+8^\circ\text{C}$ не более 1 месяца.

4.2. Предварительное разведение сывороток.

Образцы исследуемых сывороток разводят 1:10 в «БРС». Для этого смешивают 10 мкл каждой сыворотки с 90 мкл «БРС». Разведенные образцы исследуемых сывороток хранению не подлежат. Контрольные образцы «К+» и «К-» готовы к использованию.

4.3. Приготовление рабочего раствора субстрата.

Раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием в отдельной чистой емкости. В расчете на 1 стрип 0,5 мл раствора из флакона «ЦФБ» смешать с 0,5 мл «ТМБ». Раствор тщательно перемешать. Хранение: не более 10 мин при температуре $20-25^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

4.4. Хранение стрипов.

Неиспользованные стрипы хранить только в герметично закрытом пакете при температуре $2-8^\circ\text{C}$ не более месяца с момента использования.

5. Проведение иммуноферментного анализа

5.1. Приготовить рабочий раствор «ФСБ-Т» (см. п.4.1). Все компоненты набора, включая стрипы, прогреть в течение 30 мин при комнатной температуре (20-25°C).

5.2. Установить в рамке пленшета необходимое количество стрипов. **Оставшиеся стрипы сразу упаковать и хранить в соответствии с инструкцией (см. п. 4.4).**

5.3. В лунку планшета A1 внести 100 мкл «БИС» и использовать как бланк. В лунку B1 внести 100 мкл «К+», в лунки C1 и D1 внести по 100 мкл «К-». В остальные лунки планшета внести по 90 мкл «БИС» и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток, приготовленных согласно п.4.2. Окончательное рабочее разведение сывороток 1:100. После этого планшет закрыть клейкой лентой и инкубировать 30 мин при (37±1)°C в шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или 1 час при температуре (37±1)°C в термостате.

5.4. По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором «ФСБ-Т» 5 раз следующим образом:

- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- в каждую лунку внести по 300 мкл промывочного буфера, перемешать в течение 10 секунд на шейкере;
- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;

- тщательно удалить остатки содержимого лунок легкими постукиваниями перевернутой рамки по стопке фильтровальной бумаги.

5.5. После промывки и удаления влаги в каждую лунку внести «РК» объемом по 100 мкл. Планшет закрыть клейкой лентой и инкубировать 30 мин при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или 30 мин при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в термостате.

5.6. По окончании инкубации планшет промыть «ФСБ-Т» пять раз и удалить остатки влаги из планшета (см п.5.4).

5.7. Внести в каждую лунку планшета раствор субстрата объемом по 100 мкл, приготовленного согласно п.4.3. Планшет поместить на 10 мин в защищенное от света место при комнатной температуре $20\text{-}25^\circ\text{C}$.

5.8. Реакцию остановить внесением в каждую лунку 100 мкл содержимого флакона «Стоп-реагент». Перемешать содержимое лунок. Произвести измерение оптической плотности при длине волны 450 нм в течение 10 мин (см. п. 6).

6. 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 контролем конъюгата ($ОП_{кк}$) не превышает 0,15;
- в лунках с «К-» среднее значение ОП ($ОП_{К-_{ср}}$) не более 0,2;
- в лунках с «К+» значение ОП не менее 0,8.

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

$ОП_{крит}$ рассчитывают по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{К-_{ср}} + 0,2$$

Коэффициент серопозитивности (КС) сыворотки рассчитывают по формуле:

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

7. Интерпретация результатов

КС	результат
< 0,9	Отрицательный результат Указывает, что тестируемый образец либо не содержит антител класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов, либо содержит не детектируемый уровень антител.
0,9 - 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.
> 1,1	Положительный результат

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.

8. Полуколичественная оценка результатов анализа

Для оценки динамики 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 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

9. Форма выпуска

Выпускают в виде набора компонентов, включающего:

- «БРС»: буфер для разведения сывороток — 1 флакон×10 мл;
- «БИС»:буфер для инкубации сывороток — 1 флакон×10 мл;
- «РК»: раствор конъюгата — 1 флакон×12 мл;
- «ЦФБ»: цитрат-фосфатный буфер — 1 флакон×7 мл;
- «ТМБ» — 1 флакон×7 мл;
- «Стоп-реагент»: 2N раствор соляной кислоты — 1 флакон×12 мл;
- «К+»: положительный контрольный образец, в разведении 1:100, жидкая, инактивированная сыворотка крови человека — 1 флакон×1,2 мл;
- «К-»: отрицательный контрольный образец, в разведении 1:100, жидкая, инактивированная сыворотка крови человека — 2 флакона×1,2 мл;
- «ФСБ-Т»: 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с твином — 2 флакона×20 мл;
- «Иммуносорбент»: полистироловый 96-луночный разборный планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов боррелий, запаянный в пакет — 1 шт;
- Липкая лента для термостатирования планшетов;
- Инструкция по применению.

10. Срок годности, условия хранения и транспортирования.

Хранение и транспортирование проводят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от +2 до +8°C. Замораживание не допускается. Срок годности 6 месяцев. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Рекламации на качество наборов направлять в:

- Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов (ГИСК) им. Л.А. Тарасевича по адресу:

121002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек 41,
тел. (095) 241-39-22;

- на предприятие-изготовитель:

ООО «Омникс»

www.omnix.ru

194044, г. Санкт-Петербург,
пр. Большой Сампсониевский 11,
тел. (812) 542-01-01.