

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

ООО «Омникс»

KS-006 Боррелиоз-ИФА-Спектр-IgG

1. Назначение

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

Один набор рассчитан на проведение 24 определений, включая контроли.

В наборе используются рекомбинантные белки боррелий p41i, OspC, Vlse, DbpA различных геномовидов, отдельно сорбированные в лунках стрипов.

Тест-система позволяет качественно и полуколичественно интерпретировать результаты, предназначена для подтверждения положительных результатов ИФА.

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 (2 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 сорбированы рекомбинантные антигены.

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 планшета необходимое количество стрипов. Неиспользованные стрипы сразу упаковать и хранить в соответствии с инструкцией (см. п. 4.4). Порядок сорбции антигенов в горизонтальных рядах планшета следующий (каждый препарат антигена состоит из смеси индивидуальных антигенов различных геномовидов):

Ряд	Вид антигена	Включенные геномовиды		
		<i>B.burgdorferi</i> s.s.	<i>B.afzelii</i>	<i>B.garinii</i>
А и Е	p41i	+	+	+
В и F	OspC		+	+
С и G	DbpA		+	+
Д и Н	Vlse	+	+	+

Рекомендуется следующая схема эксперимента:

		1	K-				K+																
			A	B	C	D	E	F	G	H													
	p41i	2	Сыворотка №1	3	Сыворотка №3	4	Сыворотка №5	5	Сыворотка №7	6	Сыворотка №9	7	Сыворотка №11	8	Сыворотка №13	9	Сыворотка №15	10	Сыворотка №17	11	Сыворотка №19	12	Сыворотка №21
	OspC	2	Сыворотка №2	3	Сыворотка №4	4	Сыворотка №6	5	Сыворотка №8	6	Сыворотка №10	7	Сыворотка №12	8	Сыворотка №14	9	Сыворотка №16	10	Сыворотка №18	11	Сыворотка №20	12	Сыворотка №22
	DbpA	2	Сыворотка №1	3	Сыворотка №3	4	Сыворотка №5	5	Сыворотка №7	6	Сыворотка №9	7	Сыворотка №11	8	Сыворотка №13	9	Сыворотка №15	10	Сыворотка №17	11	Сыворотка №19	12	Сыворотка №21
	Vise	2	Сыворотка №1	3	Сыворотка №3	4	Сыворотка №5	5	Сыворотка №7	6	Сыворотка №9	7	Сыворотка №11	8	Сыворотка №13	9	Сыворотка №15	10	Сыворотка №17	11	Сыворотка №19	12	Сыворотка №21
	p41i	2	Сыворотка №2	3	Сыворотка №4	4	Сыворотка №6	5	Сыворотка №8	6	Сыворотка №10	7	Сыворотка №12	8	Сыворотка №14	9	Сыворотка №16	10	Сыворотка №18	11	Сыворотка №20	12	Сыворотка №22
	OspC	2	Сыворотка №2	3	Сыворотка №4	4	Сыворотка №6	5	Сыворотка №8	6	Сыворотка №10	7	Сыворотка №12	8	Сыворотка №14	9	Сыворотка №16	10	Сыворотка №18	11	Сыворотка №20	12	Сыворотка №22
	DbpA	2	Сыворотка №2	3	Сыворотка №4	4	Сыворотка №6	5	Сыворотка №8	6	Сыворотка №10	7	Сыворотка №12	8	Сыворотка №14	9	Сыворотка №16	10	Сыворотка №18	11	Сыворотка №20	12	Сыворотка №22
	Vise	2	Сыворотка №2	3	Сыворотка №4	4	Сыворотка №6	5	Сыворотка №8	6	Сыворотка №10	7	Сыворотка №12	8	Сыворотка №14	9	Сыворотка №16	10	Сыворотка №18	11	Сыворотка №20	12	Сыворотка №22

5.3. В лунки планшета А1, В1, С1, D1 внести 100 мкл «К-». В лунки Е1, F1, G1, H1 внести 100 мкл «К+». В остальные лунки планшета внести по 90 мкл «БИС» и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (в соответствии со схемой эксперимента), приготовленных согласно п.4.2. Окончательное рабочее разведение сывороток 1:100. После этого 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 1 час при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 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 20-25°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:

- в лунках с «К-» среднее значение ОП (ОП К-ср) не более 0,2;
- в лунках с «К+» значение ОП не менее 0,8.

Учет результатов сывороток проводится раздельно по каждому антигену боррелий. Первоначально для каждого антигена рассчитывают ОП_{крит} по формулам:

Антиген	Формула расчета ОП _{крит}
p41i	$ОП(p41i)_{крит} = ОП (К-)_{p41i} + 0,2$
OspC	$ОП(OspC)_{крит} = ОП (К-)_{OspC} + 0,2$
DbpA	$ОП(DbpA)_{крит} = ОП (К-)_{DbpA} + 0,2$
Vlse	$ОП(Vlse)_{крит} = ОП (К-)_{Vlse} + 0,2$

Коэффициенты позитивности (КП) для каждого антигена рассчитывают в условных единицах по формулам:

Антиген	Формула расчета КП
p41i	$КП(p41i) = ОП(p41i)_{исслед\ сыв} / ОП(p41i)_{крит}$
OspC	$КП(OspC) = ОП(OspC)_{исслед\ сыв} / ОП(OspC)_{крит}$
DbpA	$КП(DbpA) = ОП(DbpA)_{исслед\ сыв} / ОП(DbpA)_{крит}$
Vlse	$КП(Vlse) = ОП(Vlse)_{исслед\ сыв} / ОП(Vlse)_{крит}$

7. Интерпретация результатов

7.1. Результаты анализа для каждого антигена интерпретируются индивидуально.

Если $KП \geq 1$ результат считать положительным (свидетельствует о наличии специфических антител к соответствующему антигену боррелий); если значение $KП < 1$ — результат отрицательный (специфических антител к соответствующему антигену боррелий не выявлено).

7.2. Результат анализа сыворотки считается положительным (наличие специфических антител класса G к антигенам боррелий подтверждается), если значение $KП > 1$ для любых двух антигенов.

Результат расценивается как сомнительный, если значение $KП > 1$ только для одного из антигенов.

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 КП сывороток пациента, собранных с интервалом 1-2 недели.

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;
- ванночки однократного применения для растворов «РК», рабочего раствора ТМБ и «Стоп-реагента»;
- 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, д. 41,
тел. (095) 241-39-22;
- на предприятие-изготовитель:
ООО «Омникс»
www.omnix.ru
194044, г. Санкт-Петербург,
пр. Большой Сампсониевский, д. 11,
тел. (812) 542-01-01.

ДЛЯ ЗАМЕТОК