Настоящая инструкция распространяются на тест-систему диагностическую «НИФМ-ЛАЙМ-АГ», предназначенную для выявления антигена возбудителя Лайм-боррелиоза методом непрямой реакции иммунофлуоресценции в иксодовых клещах, переносчиках инфекции, для проведения лабораторных и эпидемиологических исследований.

Тест-система «НИФМ-ЛАЙМ-АГ» представляет собой комплект, основным компонентом которого является положительная сыворотка, содержащая антитела к возбудителю болезни Лайма (БЛ).

Основное свойство тест-системы - способность выявлять антиген возбудителя БЛ в иксодовых клещах за счет специфического взаимодействия антител положительной сыворотки с антигеном возбудителя. Образованный комплекс «антиген-антитело» выявляется с помощью конъюгата - античеловеческого поливалентного иммуноглобулина, меченного флюоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ).

Один набор тест-системы рассчитан на проведение 150 исследований, включая контроль.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для выявления антигена возбудителя БЛ (Borrelia burgdorferi sensu lato) в переносчиках методом, базирующемся на непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ).

2. СОСТАВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1. Положительная сыворотка (ПС), 1,5 мл. - 1 пробирка;
2.2. Антиген (Аг), служащий контрольным образцом, 0,2 мл. - 1 пробирка;
2.3. Конъюгат (Кг), 1,5 мл. - 1 пробирка;
2.4. Концентрат цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФБх 25), 20,0 мл. - 4 флакона;
2.5. Стекла предметные 8-луночные, 3 шт., стекло предметное без лунок,1 шт. - 1 упаковка;
2.6. Инструкция по применению - 1 штука.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента предприятия-изготовителя каждая серия тест-системы должна быть проверена и принята отделом биологического контроля (ОБК) изготовителя на соответствие всем показателям ТУ BY 100558032.163-2010, изм. №2.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

Биологический компонент тест-системы (положительная сыворотка – инактивированная сыворотка крови человека) и исследуемые объекты (иксодовые клещи) являются условно патогенными. Проведение исследований требует соблюдения определенных мер безопасности:

- работу проводить в специально оборудованном помещении;
- использовать индивидуальные средства защиты – перчатки медицинские одноразовые, медицинские халаты, защитные маски;
- все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующими растворами (замачивание в 3-5% растворе перекиси водорода на 3 часа). Допускается использование дезинфицирующих средств, зарегистрированных и разрешенных для применения в РБ.
- инструменты и оборудование, а также используемые рабочие поверхности необходимо до и после работы обрабатывать раствором с объемной долей этилового спирта 70%.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

5.1. Термостат (например, типа ТС-80 или аналог другой марки).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.2. Люминесцентный микроскоп (например, «ЛЮМАМ» или аналог другой марки).
5.3. Ёмкость для отмывки предметных стекол (например, Glass box and staining rack, CARL ROTH, Германия).
5.4. Магнитная мешалка (любой марки).
5.5. Инструменты для препарирования клещей.
5.6. pH-метр (любой марки).
5.7. Влажная камера или чашка Петри.
5.8. Дистиллированная вода
5.9. Посуда мерная лабораторная.
5.10. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема от 5 мкл и до 1000 мкл.
5.11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема от 5 мкл и до 1000 мкл.
5.12. Штативы для наконечников и для пробирок.
5.13. Холодильник от плюс 2 до плюс 8°С, морозильник на минус 20ºС.
5.14. Ёмкость с дезинфицирующим средством для сброса наконечников.

6. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

6.1. Объекты исследования

Основными переносчиками возбудителя Лайм-боррелиоза являются клещи Ixodes ricinus. Значительно реже боррелии обнаруживаются в клещах Dermacentor reticulatus. Исследованию подлежат как живые, так и сухие (но не плесневелые) особи любой стадии развития, последние исследуются после их предварительного размачивания в цитратно-фосфатном буферном растворе (ЦФБ) в течение 5-7 ч.

6.2. Приготовление растворов для реакции

6.2.1. Приготовление рабочего ЦФБ.

Содержимое флакона с ЦФБх25 (п. 2.4.) развести дистиллированной водой до объема 500 мл. При образовании во флаконе с концентратом кристаллов солей их необходимо растворить погружением флакона в теплую воду. После проверки pH полученного раствора (значение его должно быть в пределах 7,2-7,4) в случае необходимости скоррегировать его 1N NaOH и 1N HCl. Применяется для разведения сывороток, отмывки предметных стекол. Хранить при 4-6^{0}С до 7 дней.

6.2.2. Розлив компонентов тест-системы.

Положительную сыворотку (ПС) (п. 2.1) рекомендуется разлить по 100-200 мкл и заморозить при температуре минус 20^{0}С до использования. Размороженные реагенты могут храниться при температуре 4-6^{0}С в течение 7 дней.

Антиген (Аг) (п. 2.2) разлить по 30-50 мкл и хранить до использования при температуре минус 20^{0}С. Размороженный реагент может храниться при температуре 4-6^{0}С до 7 дней.

Конъюгат (Кг) (п. 2.3) разлить по 100-150 мкл и хранить до использования при минус 20^{0}С. Размороженный реагент можно хранить в течение 7 дней при температуре 4-6^0 С.

6.3. Проведение исследования клещей

6.3.1. Подготовка к исследованию

Предметные стекла с лунками и без лунок ополоснуть дистиллированной водой и досуха протереть.

Положительную сыворотку (п. 2.1), антиген (п. 2.2.) и конъюгат (п. 2.3) разморозить при комнатной температуре.

На предметное стекло без лунок нанести каплю рабочего ЦФБ объемом 10-20 мкл (в зависимости от размера клеща). Исследуемого членистоногого поместить в каплю брюшной стороной вверх и, прижимая верхнюю часть пинцетом к стеклу, с помощью препаровальной иглы и пинцета извлечь содержимое брюшка в каплю рабочего ЦФБ.

6.3.2. Постановка реакции

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перенести в лунку предметного стекла с помощью пипеточного дозатора жидкую фракцию приготовленной суспензии, не допуская попадания в наконечник дозатора крупных частиц.

В одну из лунок предметного стекла внести 10 мкл антигена (Аг).

Препарат подсушить при комнатной температуре или в термостате при 37^0С, ополоснуть дистиллированной водой и снова подсушить.

В каждую лунку внести по 10 мкл положительной сыворотки (ПС). Инкубировать во влажной камере при 37^0С в течение 30 мин.

По окончании инкубации стекло ополоснуть дистиллированной водой и отмыть в рабочем ЦФБ в течение 10-15 мин. на магнитной мешалке, снова ополоснуть дистиллированной водой и подсушить.

В каждую лунку внести по 10 мкл конъюгата (Кг). Инкубировать во влажной камере при 37^0С в течение 30 мин.

По окончании инкубации стекло ополоснуть дистиллированной водой, отмыть в рабочем ЦФБ в течение 10-15 мин. на магнитной мешалке, снова ополоснуть дистиллированной водой и подсушить.

6.3.3. Учет реакции и оценка результатов

Препараты просмотреть в люминесцентном микроскопе типа «ЛЮМАМ» с водно-иммерсионным объективом 70×, тубусом 1,6× и окуляром не менее 6,3× или масляным иммерсионным объективом 90×, тубусом 1,1× и окуляром не менее 5×, фильтры БС8-3 и СЗС24.

Просмотр начать с лунки с контролем (Аг), в которой должна наблюдаться зеленая окраска антигена (боррелий). Каждую лунку препарата необходимо просматривать во всех полях зрения микроскопа. Обнаружение даже одной боррелии, идентичной с таковыми в лунке с Аг, расценивается как положительный результат.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Отработанные предметные стекла могут быть использованы повторно после их замачивания в 3-5% растворе перекиси водорода в течение 3 часов, тщательного натирания губкой в растворе детергента, многократного промывания в проточной, а затем - в дистиллированной воде.

7. ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система для выявления антигена возбудителя болезни Лайма в иксодовых клещах методом непрямой иммунофлюоресценции «НИФМ-ЛАЙМ-АГ» выпускается в виде упакованного комплекта. Один набор тест-системы рассчитан на проведение 150 исследований, включая контроль.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Тест-система должна храниться при температуре минус 20ºС. При транспортировании не допускать размораживания.

Концентрат ЦФБх25 можно хранить при любой температуре, срок его хранения не ограничен.

Срок годности тест-системы - 12 месяцев со дня выпуска.

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие тест-системы требованиям ТУ BY 100558032.163-2010, изм. №2, при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru