«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (болезнь Лайма)

«ЛаймБест – IgG»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления специфических иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (болезнь Лайма) в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли (по 3 лунки в каждой постановке ИФА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод определения основан на твердофазном непрямом иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов. Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах антител к *Borrelia burgdorferi s.l.*, они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой связывается с антителами, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело». Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце антител к *Borrelia burgdorferi s.l.*

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицатель-

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

ные.

2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

– планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Borrelia burgdorferi s.l.* – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащей антитела класса IgG к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов – слегка опалесцирующая жидкость малинового цвета – 1 флакон (0,5 мл);

– отрицательный контрольный образец ($К^–$), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащей антитела класса IgG к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов – слегка опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета – 1 флакон (0,5 мл);

– конъюгат – моноклональные антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена – лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 или 2 флакона;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании – 1 флакон (28 мл);

– раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (3,0 мл);

– раствор для разведения сывороток (РС) – непрозрачная жидкость красного цвета – 1 флакон (13 мл);

– раствор для разведения конъюгата (РК) – непрозрачная жидкость зеленого цвета – 1 флакон (13 мл);

– раствор тетраметилбензидина – прозрачная бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость – 1 флакон (13 мл);

или

– тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (1,5 мл)

и субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (13 мл);

– стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

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

– пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;

– ванночками для реагентов – 2 шт.;

– наконечниками для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора, определённая по сывороткам стандартной панели предприятия, содержащим специфические IgG к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (СПП 05-2-245), составляет 100 %.

3.2. Специфичность набора, определённая по сывороткам стандартной панели предприятия, не содержащим специфические IgG к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (СПП 05-2-245), составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;

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

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток, а также хранившихся при минус 20 °С.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать сыворотки с признаками микробной контаминации, гемолизированные, гиперлипидные или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Сразу после постановки реакции неиспользованный планшет и плотно закрытые флаконы с исходными компонентами необходимо поместить в холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С.

Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

При промывке лунки *(стрипа, планшета)* заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть заметного роста микроорганизмов. Раз в неделю ёмкость для промывочного раствора и шланги следует промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов

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

(ФСБ-Т×25, СБР, концентрат ТМБ, раствор тетраметилбензидина, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать **одноразовые** наконечники для дозаторов.

Посуду *(ванночки)*, используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду *(ванночки)* для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду *(ванночки)* для раствора ТМБ сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС *(четвертичных аммониевых соединений)*, спиртов, третичных аминов.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Приготовление иммуносорбента

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку планшета необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С до 1 месяца.

7.2.2. Приготовление промывочного раствора

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед использованием при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 (см таблицу расхода компонентов) и развести его дистиллированной водой до указанного в таблице объёма.

Хранение: до 72 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.2.3. Приготовление контрольных образцов

Контрольные образцы ($К^+$ и $К^-$) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

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

7.2.4. Приготовление растворов конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – при температуре от 2 до 8 °С до 2 недель. Расфасованный на аликвоты концентрированный раствор конъюгата допускается хранить при температуре минус 18 °С и ниже в течение 1 мес.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК).

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество (см таблицу) концентрированного раствора конъюгата (необходимое количество раствора конъюгата зависит от числа используемых стрипов и рассчитывается с использованием коэффициента α, который подбирается производителем для каждой серии наборов и указывается в инструкции, вкладываемой в набор), добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Конъюгат в рабочем разведении <u>хранению не подлежит</u>.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Конъюгат в предварительном разведении, мкл	α*	2×α	3×α	4×α	5×α	6×α	7×α	8×α	9×α	10×α	11×α	12×α
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ, концентрат, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

α*=_____ мкл

<u>Примечание:</u> * – количество (в мкл) указано в паспорте и инструкции на данную серию наборов.

7.2.5. Приготовление раствора ТМБ

<u>Внимание</u>! Раствор тетраметилбензидина готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина.

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

Если в состав набора входит концентрат ТМБ и СБР, то раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием. В ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ в соответствии с числом используемых стрипов (см таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать пипетированием. Раствор ТМБ в рабочем разведении стабилен в течение 3 ч при условии его хранения при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

7.3. Проведение анализа

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.2.). Все растворы должны иметь температуру от 18 до 25°С. Подготовить необходимое количество стрипов к работе (п. 7.2.1.).

7.3.1. Во все лунки стрипов внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РС).

В одну лунку внести 10 мкл положительного контрольного образца ($К^+$), в две другие лунки по 10 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$), в остальные лунки – по 10 мкл цельных исследуемых образцов сыворотки или плазмы.

Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 5 раз).

7.3.2. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 60 мин при температуре (37±1)°С.

7.3.3. За 5-10 мин. до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (см п. 7.2.4).

7.3.4. По окончании инкубации промыть стрипы планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.2.2.).

Внимание! Каждую лунку необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы планшета заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при (37±1) °С.

7.3.6. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше

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

(см п. 7.3.4.).

7.3.6. Приготовить раствор ТМБ (п. 7.2.5).

Внести в каждую лунку стрипов по 100 мкл раствора тетраметилбензидина или раствора ТМБ в рабочем разведении.

Стрипы поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре от 18 до 25 °С.

7.3.7. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований оценивать только при соблюдении следующих условий:

– в лунках с отрицательным контрольным образцом среднее значение ОП ($ОП_{ср}К^-$) – не более 0,2;

– в лунке с положительным контрольным образцом значение ОП ($ОПК^+$) должно быть не менее 0,8.

Критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) вычислить по следующей формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}\ (К^-) + 0{,}2,$$

где: $ОП_{ср}(К^-)$ – среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

9.2. Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если значение ОП в соответствующей лунке равно или превышает $ОП_{крит}$.

Исследуемую сыворотку расценивать как отрицательную, если значение ОП в соответствующей лунке не превышает $ОП_{крит}$.

Исследуемые сыворотки, дающие ОП в пределах «серой зоны» ($ОП_{крит} \pm 10\%$), требуют особого внимания. Такие сыворотки подлежат обязательному повторному анализу. В случае воспроизведения результата в пределах «серой» зоны, пациенты подлежат обязательному наблюдению в динамике.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора **«ЛаймБест – IgG»** обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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