

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов
класса М к возбудителям иксодовых
клещевых боррелиозов (болезнь Лайма)
(ЛаймБест – IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления специфических иммуноглобулинов класса М к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*) (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 твёрдофазном 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 IgM 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 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

После измерения ОП раствора в лунках на основании рассчитанного значения ОП_{крит} анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

- Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной

воды:

- планшет разборный с иммобилизованными ре-комбинантными антигенами *Borrelia burgdorferi* s.l. – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инаktivированный – 1 фл., 0,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инаktivированный – 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат, концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения сывороток (РС) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнками для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.;
- планшетом разборным для предварительного разведения – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора по сывороткам стандартной панели предприятия – 100%.

3.2. Специфичность набора по сывороткам стандартной панели предприятия – 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 1 (*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 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения ОП 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 620–655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- 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;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, а также хранившихся при минус (18–60) °С.

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

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 мин.
- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.
- После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем и хранить при температуре (2–8) °С в течение 1 месяца. Флаконы с исходными компонентами после вскрытия плотно закрыть и хранить при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности.
- Раствор 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 край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.
- Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (*ФСБ-Т×25, СБР, концентрат ТМБ, стоп-реагент*), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».
- Наконечники для пипеток (*автоматических дозаторов*) следует использовать **однократно**.

- 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 необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.
- Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших 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, спиртов, третичных аминов (МУ-231-113 от 29.10.98).
- Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать 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 (2–8) °C 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 разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: при температуре (2–8) °C до 5 суток.

7.2.3. Приготовление контрольных образцов.

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

Хранение: при температуре (2–8) °C в течение всего срока годности набора.

7.2.4. Предварительное разведение исследуемых образцов

Внимание! Предварительное разведение исследуемых образцов готовить непосредственно перед использованием!

Исследуемые образцы развести в 10 раз РПРС. Для этого в лунки стрипов планшета для предварительного разведения внести по 90 мкл РПРС и по 10 мкл исследуемых образцов. Тщательно перемешать пипетированием.

7.2.5. Приготовление раствора конъюгата.

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

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно перемешать содержимое флаконов с конъюгатом и с РК. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.2.6. Приготовление раствора ТМБ.

Внимание! Раствор ТМБ готовить в пластиковой ванночке, прилагаемой к набору, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать **только** для работы с ТМБ.

В ванночку для реагентов отобрать необходимое количество концентрата ТМБ в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

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, концентрат, мкл	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
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

Внимание! Допустимо голубое окрашивание раствора ТМБ в рабочем разведении, которое не оказывает влияния на результаты анализа.

Раствор стабилен в защищённом от света месте при (18–25) °С до 3-х часов.

7.3. Проведение анализа.

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

7.3.1. Во все лунки стрипов внести по **90 мкл РС**.

В одну лунку внести **10 мкл K^+** , в две другие лунки по **10 мкл K^-** , в остальные лунки – по **10 мкл** предварительно разведённых **исследуемых образцов** (см. п. 7.2.4), получая, таким образом, конечное разведение образцов 1:100.

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

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

7.3.3. За 5–10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (см п. 7.2.5).

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 перевёрнутыми 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 плёнкой и инкубировать при (37±1) °С **30 мин**.

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 (см п. 7.3.4).

7.3.7. Приготовить раствор ТМБ (п. 7.2.6).

Внести в каждую лунку стрипов по **100 мкл раствора ТМБ**.

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

Стрипы поместить в защищённое от света место при температуре (18–25) °С на **25 мин**.

7.3.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по **100 мкл стоп-реагента** и через 2–3 минуты измерить 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 ОП в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований оценивать только при соблюдении следующих условий:

- в лунках с отрицательным контрольным образцом среднее значение ОП ($ОП_{срK^-}$) – не более 0,2;
- в лунке с положительным контрольным образцом значение ОП ($ОП_{срK^+}$) должно быть не менее 0,4.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,2,$$

где: $ОП_{ср}(K^-)$ – 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 ниже $ОП_{крит}$.

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.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °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 (2–8) °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,

тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;

тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;

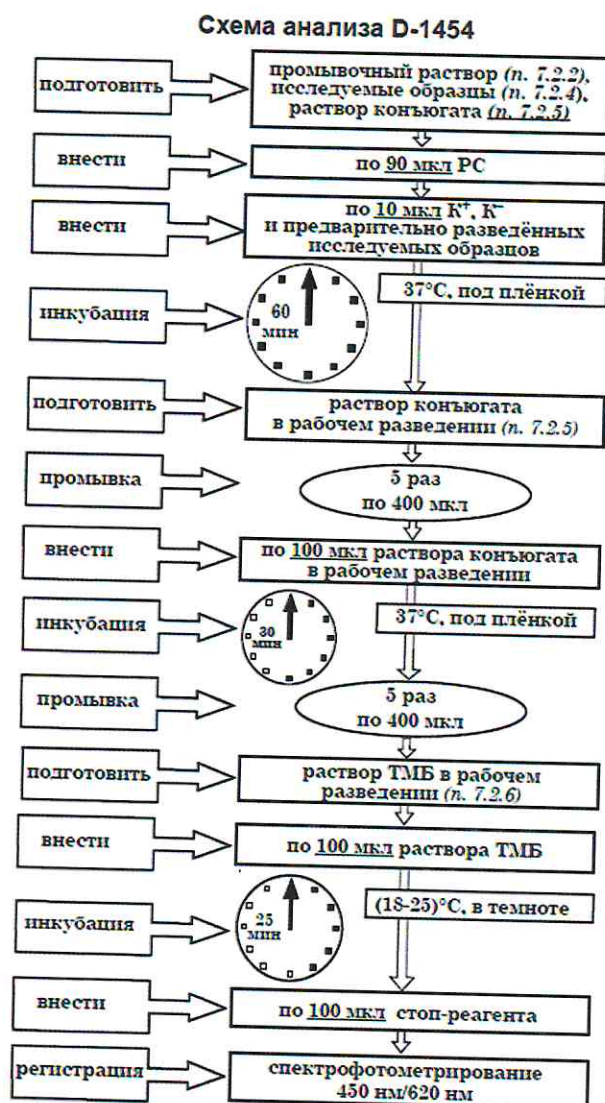
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (*утилизируются*) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов

следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;

- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (*потребительские свойства*) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.



1. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения п количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 332-24-48.