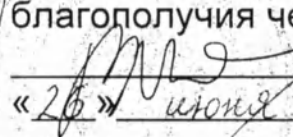


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И.Покровский
«26» июня 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления антител классов G и M
к возбудителям иксодового клещевого боррелиоза
(*Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*) в клиническом материале в
формате иммуночипа с флуоресцентной детекцией

«ИммуноЧип Боррелиоз»



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	7
СОСТАВ.....	9
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
А. Приготовление растворов.....	11
Б. Подготовка лиофилизированных контролей к работе	12
В. Проведение анализа	12
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	18
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	19

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ИКБ	- иксодовый клещевой боррелиоз
КК	- конъюгат, 101-кратный концентрат
КП	- коэффициент позитивности
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
РО	- раствор для отмывки иммуносорбента, 10-кратный концентрат
РРОК	- раствор для разведения образцов и концентрата конъюгата
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
IgG	- иммуноглобулины, антитела класса G
IgM	- иммуноглобулины, антитела класса M

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«ИммуноЧип Боррелиоз»** предназначен для выявления антител классов G и M к спектру антигенов возбудителей ИКБ (*Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*) в клиническом материале (сыворотке крови, плазме крови, спинномозговой жидкости человека) в формате иммуночипа с флуоресцентной детекцией.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный набор реагентов предназначен для качественного *in vitro* определения антител (иммуноглобулинов) классов G (IgG) и M (IgM) в сыворотке или плазме крови человека или в спинномозговой жидкости человека. На первой стадии в эрреях иммуносорбента (микроскопных слайдах с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* и вспомогательными контрольными спотами) проводят инкубацию клинических/контрольных образцов в конечном разведении 1:10 (разведение образцов осуществляется в процессе проведения анализа за счет внесения раствора для разведения образцов и концентрата конъюгата). Имеющиеся в положительных образцах специфичные к боррелиям антитела классов G и/или M связываются с антигенами на иммуносорбенте. На второй стадии образовавшийся иммунный комплекс антиген-антитело выявляют с помощью инкубации с конъюгатом, представляющим собой смесь антител к IgG и IgM человека, меченых флуорофорами Cy5 и Cy3

соответственно. Результат оценивают с помощью флуоресцентного сканера/имиджера.

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ИммуноЧип-48».

Форма 2 включает комплект реагентов «ИммуноЧип-48» вариант L.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения исследования клинического материала (сыворотки крови, плазмы крови, спинномозговой жидкости человека) на наличие антител классов G и M к спектру антигенов возбудителей ИКБ (*Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*) в формате иммуночипа с флуоресцентной детекцией.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность

ВНИМАНИЕ! Указанная чувствительность набора реагентов приведена с целью демонстрации возможности выявления специфических антител классов G и/или M в зависимости от стадии заболевания ИКБ. Использование другой репрезентативной выборки клинического материала может дать отличные от приведенных здесь данных результаты.

Для оценки чувствительности набора исследованы:

- 51 образец сыворотки/плазмы крови пациентов с подтвержденным клинически и лабораторно острым течением ИКБ (продолжительность заболевания – до 3 месяцев), у 45 пациентов (88,2%) отмечалась мигрирующая эритема;
- 55 сывороток крови взяты от пациентов с подострым течением ИКБ (продолжительность заболевания от 3 до 6 месяцев), при этом, у 43 пациентов (78,2%) в дебюте заболевания отмечалась мигрирующая эритема. В этой группе у 15 пациентов из 55 установлен нейроборрелиоз, у 25 больных – Лайм-артрит, у остальных наблюдались различные органические поражения (множественные артралгии, изменения со стороны сердечно-сосудистой системы);

- 56 образцов сывороток крови от пациентов с хроническим течением ИКБ, при этом у 52 пациентов (92,9%) в дебюте заболевания регистрировалась мигрирующая эритема. В этой группе у 26 пациентов выявлена склеродермия, у 10 пациентов - Лайм-артрит, у 6 пациентов установлен нейроборрелиоз, 8 больных с хроническим атрофическим акродерматитом. Результаты приведены в табл. 1

Таблица 1

Выявление специфических антител классов G и/или M у больных ИКБ
(диагностическая чувствительность)

Стадия ИКБ	IgM		IgG		IgM и/или IgG (положительный результат)
	положительный результат	неопределенный результат	положительный результат	неопределенный результат	
I	56,8%	11,8%	47,1%	16,7%	80,4
II	60,0%	3,6%	78,8%	9,1%	92,7%
III	35,7%	5,4%	96,4%	1,8%	100%

Диагностическая специфичность

ВНИМАНИЕ! Использование другой репрезентативной выборки клинического материала может дать отличные от приведенных здесь данных результаты.

Для оценки специфичности набора была сформирована контрольная группа, из 400 образцов сывороток/плазмы крови лиц, среди которых: 250 образцов от практически здоровых доноров, 50 образцов от беременных женщин, 50 образцов от пациентов с аутоиммунными заболеваниями; 50 образцов от больных сифилисом.

Анализ с помощью набора сывороток крови человека контрольной группы показал отсутствие специфических IgM для 97,8 % образцов, IgG для 97 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей серологические исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как потенциально инфекционно опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя

дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Для проведения серологического анализа исследуемого материала требуются:

1. ПО для анализа и интерпретации данных сканирования биочипов IMSTAR.
2. Многоканальный флуоресцентный сканер/имиджер для биочипов с возможностью считывания результатов по двум каналам: Cy5/Red и Cy3/Green (рекомендуемая модель сканера - MArS версии 1.0.32 и выше, Ditabis, Германия). Рекомендуемый режим сканирования: разрешение 10 мкм/пиксель.
3. Прилагаемое к сканеру/имиджеру ПО (например, ПО SpotScout Pro для сканера MArS, Ditabis, Германия), совместимое с текущей версией ПО для анализа и интерпретации данных сканирования биочипов IMSTAR.
4. Ламинарный бокс или рабочий медицинский стол.
5. Термошейкер (например, PST-60HL-4, BioSan, Латвия).
6. Центрифуга (например, LMC-3000, BioSan, Латвия).
7. Вакуумный медицинский отсасыватель с колбой-ловушкой (например, «ОМ-1», Россия) или вошер, имеющий функцию работы со слайдами в режиме FastFRAME (например, 3D-вошер INTELIWASHER 3D-IW8, BioSan, Латвия).
8. Комплект электронных или механических дозаторов переменного объема 5-40, 40-200, 200-1000 мкл, 1-5 мл (например, «Ленпипет», Россия).
9. Рамка-держатель для 4 слайдов (например, модель FAST FRAME, Whatman Inc, кат.№ 104806001, США)

10. Трафарет-16-инкубационная камера (например, модель кат.№ 10486046, Whatman Inc., США)
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, США).
12. Центрифужные пробирки на 50 мл с коническим дном (например Corning, США).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов 0,5 – 200 мкл, 100 - 1000 мкл, 1000 - 5000 мкл (например, Axugen, США).
14. Штативы для наконечников (например, Axugen, США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
15. Холодильник от 2 до 8 °С
16. Индивидуальный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
17. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
18. Персональный компьютер для работы с многоканальным сканером/имиджером для биочипов. Рекомендуется использовать компьютер с многоядерным процессором 2GHz, с установленной операционной системой Windows XP – Win7 (32 бит), оперативной памятью не менее 2 GB (4GB рекомендуется), памятью жесткого диска не менее 216 GB, установленным программой Acrobat, версии 6.0 или выше и имеющим порт USB 1.0.
19. Мерный цилиндр на 100, 500 мл по ГОСТ 1700-74.

Примечание – в отношении позиций 2-19 допускается применение оборудования/материалов аналогичного типа, которые по своим характеристикам не уступают рекомендуемым.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для проведения серологического исследования используется плазма/сыворотка периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак. Хранить плазму/сыворотку крови можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С. Для исключения ложных результатов нельзя подвергать образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Каждый образец отбирают отдельным наконечником. Образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 2 раз. Образцы проросшие, с выраженным гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием в течение 10-15 мин при 3000 об/мин

При необходимости проведения исследования спинномозговой жидкости человека данный клинический материал можно хранить не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

ВНИМАНИЕ! Исследование СМЖ пациента на наличие антител к боррелиям необходимо проводить одновременно с исследованием его сыворотки/плазмы крови.

СОСТАВ

Комплект реагентов «ИммуноЧип-48» – комплект реагентов для выявления антител классов G и M к спектру антигенов возбудителей ИКБ (*Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*) в клиническом материале с флуоресцентной детекцией – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Иммуносорбент Боррелиоз	Микроскопные слайды	–	4 шт.
Конъюгат, 101-кратный концентрат	Бесцветная жидкость или светло-голубого или светло-розового цвета	0,05	1 пробирка
Раствор для разведения образцов и концентрата конъюгата	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость светло-желтого или желтого цвета	10,0	1 флакон
Раствор для отмывки иммуносорбента, 10-кратный концентрат	Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость ¹	40,0	1 флакон
K ⁺ Боррелиоз	Прозрачная или слегка мутноватая жидкость, светло-соломенного, светло-желтого или желтого цвета	0,05	1 пробирка
K ⁻ Боррелиоз	Прозрачная или слегка мутноватая жидкость, светло-соломенного, желтого или светло-желтого цвета	0,05	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 определений, включая контроли.

Входит в форму комплектации 1.

Комплект реагентов «ИммуноЧип-48» вариант L – комплект реагентов для выявления антител классов G и M к спектру антигенов возбудителей ИКБ (*Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*) в клиническом материале с флуоресцентной детекцией – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Иммуносорбент Боррелиоз	Микроскопные слайды	–	4 шт.
Конъюгат, 101-кратный концентрат	Бесцветная жидкость или светло-голубого или светло-розового цвета	0,05	1 пробирка

¹ Допустимо образование кристаллического осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°C.

Раствор для разведения образцов и концентрата конъюгата	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость светло-желтого или желтого цвета	10,0	1 флакон
Раствор для отмывки иммуносорбента, 10-кратный концентрат	Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость ²	40,0	1 флакон
K ⁺ _{Боррелиоз} -Iyo	Порошок светло-желтого цвета	-	3 пробирки
K ⁻ _{Боррелиоз} -Iyo	Порошок светло-желтого цвета	-	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 определений, включая контроли. Входит в форму комплектации 2.

К набору реагентов прилагается вкладыш или CD-диск со схемой расположения спотов, параметрами для расчета, интерпретации и оценки валидности результатов с помощью ПО IMSTAR, а также другая важная информация для пользователей.

Описание реагентов из комплекта «ИммуноЧип-48» и «ИммуноЧип-48» вариант L:

- иммуносорбенты (микроскопные слайды) с иммобилизованными в пределах каждого эррея³ рекомбинантными антигенами *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*, и вспомогательными маркерами для оценки валидности (схема расположения спотов в одном эррее приведена во вкладыше или записана на CD-диске, которые прилагаются к набору),
- конъюгат, 101-кратный концентрат (КК), содержащий антитела к IgG человека, модифицированные флуорофором Cy5, и антитела к IgM человека, модифицированные флуорофором Cy3, соответственно,
- раствор для разведения образцов и концентрата конъюгата (РПОК),
- раствор для отмывки иммуносорбента, 10-кратный концентрат (РО),
- положительный контрольный образец (K⁺_{Боррелиоз}), инактивированный, содержащий антитела к боррелиям *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* класса G и/или M и не содержащий антитела к вирусу гепатита С, ВИЧ, возбудителю сифилиса, антигены ВИЧ и HBsAg,

² допустимо образование кристаллического осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С.

³ Эррей – ограниченная зона на слайде для постановки одного клинического/контрольного образца, содержащая набор иммобилизованных антигенов и других вспомогательных маркеров в виде индивидуальных спотов (точек).

- отрицательный контрольный образец (K[–]_{Боррелиоз}), инактивированный, не содержащий антитела к боррелиям *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* класса G и/или M, а также антитела к вирусу гепатита С, ВИЧ, возбудителю сифилиса, антигены ВИЧ и HBsAg.
- лиофилизированный положительный контрольный образец (K⁺_{Боррелиоз-IyO}), инактивированный, лиофилизированный, содержащий антитела к боррелиям *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* класса G и/или M и не содержащий антитела к вирусу гепатита С, ВИЧ, возбудителю сифилиса, антигены ВИЧ и HBsAg,
- лиофилизированный отрицательный контрольный образец (K[–]_{Боррелиоз-IyO}), инактивированный, лиофилизированный, не содержащий антитела к боррелиям *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* класса G и/или M, а также антитела к вирусу гепатита С, ВИЧ, возбудителю сифилиса, антигены ВИЧ и HBsAg.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока годности. Перед использованием все компоненты набора следует выдержать 30 мин при комнатной температуре.

А. Приготовление растворов

ВНИМАНИЕ! Все растворы необходимо отбирать одноразовыми наконечниками.

Объемы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве иммуносорбентов (слайдов) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количество иммуносорбентов в одной постановке	Количество используемых компонентов для приготовления рабочего раствора конъюгата		Количество используемых компонентов для приготовления рабочего раствора для отмывки иммуносорбента (при ручной отмывке с помощью дозатора)	
	КК, мкл	РРОК, мл	РО, мл	дистиллированная вода, мл
1	12	1,2	0,7	6,3
2	24	2,4	1,4	12,6
3	36	3,6	2,1	18,9
4	48	4,8	2,8	25,2

ВНИМАНИЕ! Использование вошера, имеющего функцию работы со слайдами, помещенными в рамки-держатели, приводит к увеличению расхода рабочего раствора для отмывки иммуносорбента. В зависимости от модели вошера, объем рабочего раствора для отмывки может достигать 100 мл при работе с одним иммуносорбентом.

Рабочее разведение конъюгата готовить перед использованием за 10-20 мин до его внесения. Хранить не более 2 час при температуре от 18 до 25 °С, в защищенном от света месте.

Рабочий раствор для отмывки иммуносорбента хранится не более 3 суток при температуре от 2 до 8°С.

Б. Подготовка лиофилизированных контролей к работе

1. Содержимое пробирок с лиофилизированными контрольными образцами $K^{+}_{\text{Боррелиоз-IyO}}$ и $K^{-}_{\text{Боррелиоз-IyO}}$ осадить на вортексе, аккуратно открыть крышки и, избегая распыления содержимого, добавить дистиллированной воды в количестве 0,025 мл.
2. Аккуратно ресуспендировать содержимое пробирок путем перемешивания с помощью вортекса или пипетированием не менее 10 раз.
3. Плотнo закрыть пробирки и оставить их на 10 мин при комнатной температуре.
4. После полного растворения осадить содержимое пробирок на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.

Восстановленные лиофилизированные образцы $K^{+}_{\text{Боррелиоз-IyO}}$ и $K^{-}_{\text{Боррелиоз-IyO}}$ хранить при температуре от 2 до 8°С не более 2 мес.

В. Проведение анализа

1. Вскрыть фольгированный пакет и извлечь из пластмассового бокса необходимое количество иммуносорбентов. Неиспользованные иммуносорбенты оставить в закрытом пластмассовом боксе в фольгированном пакете, при этом пакет следует плотно закрыть с помощью скрепки, предварительно свернув край пакета 2-3 раза. Осушитель (силикагель) из пакета не удалять! После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 6 мес при температуре от 2 до 8°С.
2. Промыть иммуносорбент **один раз рабочим раствором для отмывки иммуносорбента (РО) в течение 1-2 мин при комнатной температуре**, аккуратно опустив его в подходящую чистую емкость, содержащую рабочий РО, например, в центрифужную пробирку на 50 мл или пластмассовый бокс для хранения иммуносорбентов из набора (в случае единовременной постановки всех четырех иммуносорбентов).

Необходимо следить за тем, чтобы уровень раствора полностью покрывал рабочую поверхность слайда до его матового поля. Процедуру отмывки иммуносорбента можно проводить как ручную, при этом следует время от времени покачивать емкость с погруженным в рабочий РО слайдом, так и с

использованием термошейкера/шейкера/орбитальной качалки с вращением платформы не более 500 об/мин.

Через 1 -2 мин аккуратно вынуть иммуносорбент из емкости с рабочим раствором РО, например, с помощью пинцета, придерживая слайд за его матовое поле. Высушить иммуносорбент (сбросить капли), например, с помощью центрифуги (режим центрифугирования - 1 мин при 1000 об/мин), поместив слайд в чистую центрифужную пробирку на 50 мл, или под конвекционным потоком воздуха.

3. Установить в рамке-держателе для слайдов необходимое количество иммуносорбентов, предварительно аккуратно надев сверху на слайд на стороне маркировки 16-луночный трафарет для предотвращения контаминации образцов. При необходимости промаркировать иммуносорбент.

ВНИМАНИЕ! Для нанесения подписи на иммуносорбенты использовать только маркеры (фломастеры) с черным перманентом во избежание искажения фоновой флуоресценции на слайде. В ходе работы необходимо держать слайды за боковую поверхность или матовое поле, не касаясь рабочего поля иммуносорбента.

4. В каждый эррей иммуносорбента внести по **90 мкл РРОК**. В любые 10 эрреев внести по **10 мкл исследуемых образцов**. В один из эрреев иммуносорбента внести **10 мкл К⁺Боррелиоз** (или **10 мкл восстановленного К⁺Боррелиоз-Iyo**, в зависимости от используемого комплекта), а также в один из эрреев внести **10 мкл К⁻Боррелиоз** (или **10 мкл восстановленного К⁻Боррелиоз-Iyo**, в зависимости от используемого комплекта). Рамку-держатель с иммуносорбентом закрыть крышкой. Инкубировать 30 мин на термошейкере с вращением платформы 500 об/мин при 37°C.

5. Промыть иммуносорбент **два раза** по 1-2 мин **рабочим раствором для отмывки иммуносорбента**, внося в каждый эррей по **100 мкл** раствора. Процедуру отмывки иммуносорбента можно проводить с помощью вошера с функцией работы со слайдами биочипов или вакуумного медицинского отсасывателя с колбой-ловушкой с использованием термошейкера с вращением платформы 500 об/мин при температуре 20 - 37°C.

ВНИМАНИЕ! Процедуру отмывки иммуносорбента необходимо проводить так, чтобы не допустить повреждения центрального рабочего поля иммуносорбента внутри эрреев, ограниченных трафаретом.

6. В каждый эррей иммуносорбента внести по **100 мкл рабочего раствора конъюгата**, закрыть иммуносорбент крышкой и инкубировать 30 мин на термошейкере с вращением платформы 500 об/мин при 37°C.
7. Повторить п.5.

8. Разобрать рамку-держатель для слайдов, снять с иммуносорбента трафарет, иммуносорбент ополоснуть дистиллированной водой.
9. Высушить слайды (сбросить капли), например, с помощью центрифуги или под конвекционным потоком воздуха.
10. Перейти к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Для анализа результатов сухие иммуносорбенты после проведения всех вышеуказанных этапов проведения анализа помещают в многоканальный флуоресцентный сканер для биочипов, активируя каналы Cy5/Red и Cy3/Green (рекомендуемый сканер для биочипов - MarS, Ditabis, Германия с прилагаемым к нему ПО SpotScout Pro, используя установки, указанные во вкладыше или записанном на CD-диске, прилагаемом к набору реагентов).
2. Полученные результаты сканирования по двум каналам, отражающие специфические сигналы флуоресценции каждого спота и фоновые значения на эррее в виде выходных файлов, сохраняют в форматах, поддерживаемых используемым сканером/имиджером (форматы GRP, Excel, CSV). Выходному файлу присваивается соответствующее наименование.
3. После сканирования проводят визуальную оценку валидности проведения анализа по флуоресцентным профилям эрреев.

Анализ считают валидным (достоверным), если соблюдаются следующие условия:

- на специфическом канале Cy5/Red (определение антител класса G) в пределах каждого эррея должны флуоресцировать споты, соответствующие иммобилизованному препарату IgG человека,
 - на специфическом канале Cy3/Green (определение антител класса M) в пределах каждого эррея должны флуоресцировать споты, соответствующие иммобилизованному препарату IgM человека,
 - в пределах каждого эррея на обоих каналах должны флуоресцировать споты, соответствующие маркерам границы эррея.
4. Проводят анализ выходного файла с использованием ПО для анализа и интерпретации данных сканирования биочипов IMSTAR, согласно Инструкции к данному ПО. При работе с ПО для вычисления средних значений КП для каждого из 14 антигенов *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* и анализа валидности полученных результатов вводят ряд обязательных параметров, значения которых устанавливаются предприятием-изготовителем для серии наборов и указываются во вкладыше или на CD-диске, прилагаемых к набору.

Канал Cy5/Red отражает наличие или отсутствие специфических антител класса G (IgG) к антигенам *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*, на канале Cy3/Green детектируются специфические антитела класса M (IgM).

ВНИМАНИЕ! Дифференцирование антител по классам осуществляется независимо по каждому из каналов.

При получении среднего КП $\geq 1,1$ на канале Cy5/Red для определенного антигена – выявлены антитела класса G к данному антигену.

При получении КП $< 1,1$ на канале Cy5/Red для определенного антигена – не выявлены антитела класса G к данному антигену.

При получении среднего КП $\geq 1,1$ на канале Cy3/Green для определенного антигена – выявлены антитела класса M к данному антигену.

При получении КП $< 1,1$ на канале Cy3/Green для определенного антигена – не выявлены антитела класса M к данному антигену.

Далее интерпретацию результатов проводят по суммарному результату наличия (отсутствия) антител к восьми группам антигенов *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* (состав группы антигенов см. табл. 3) в соответствии с критериями интерпретации (см. табл. 4 и 5).

ВНИМАНИЕ! ПО IMSTAR предусматривает возможность выдачи результатов в соответствии с критериями интерпретации.

Таблица 3

Группы антигенов

Рекомбинантные антигены в составе иммуносорбента	Группы антигенов
p100 <i>Borrelia garinii</i>	p100
p100 <i>Borrelia afzelii</i>	
VlsE <i>Borrelia garinii</i>	VlsE
VlsE <i>Borrelia afzelii</i>	
p39 <i>Borrelia afzelii</i>	p39
p41 <i>Borrelia garinii</i>	p41
p41 <i>Borrelia afzelii</i>	
p58 <i>Borrelia afzelii</i>	p58
BBK32 <i>Borrelia garinii</i>	BBK32
BBK32 <i>Borrelia afzelii</i>	
OspC <i>Borrelia garinii</i>	OspC
OspC <i>Borrelia afzelii</i>	
p17 <i>Borrelia garinii</i>	p17
p17 <i>Borrelia afzelii</i>	

Критерии интерпретации в иммуночипе на наличие/отсутствие антител класса G (IgG) на канале Cy5/Red

Отрицательный результат	1. Не выявлены антитела для антигенов <i>Borrelia afzelii</i> и <i>Borrelia garinii</i>; 2. Выявлены антитела только для антигенов группы p17.
Положительный результат	1. Выявлены антитела для всех антигенов <i>Borrelia afzelii</i> и <i>Borrelia garinii</i>; 2. Выявлены антитела только для антигенов группы VlsE (в сочетании или без антител к другим группам антигенов); 3. Выявлены антитела как минимум для двух групп антигенов из списка: p100, p41, p17, OspC, p58, Bbk32, p39.
Неопределенный результат	Определены антитела для одной группы антигенов из списка: p100, p41, OspC, p58, Bbk32, p39

Критерии интерпретации в иммуночипе на наличие/отсутствие антител класса M (IgM) на канале Cy3/Green

Отрицательный результат	1. Не выявлены антитела для антигенов <i>Borrelia afzelii</i> и <i>Borrelia garinii</i>; 2. Выявлены антитела только к антигенам группы p100
Положительный результат	1. выявлены антитела для всех антигенов <i>Borrelia afzelii</i> и <i>Borrelia garinii</i>; 2. Выявлены антитела к антигенам группы OspC (в сочетании или без антител к другим группам антигенов); 3. Выявлены антитела как минимум для двух групп антигенов из списка: p41, p17, VlsE.
Неопределенный результат	Выявлены антитела только для одной группы антигенов из списка: p41, VlsE, p17 (в сочетании или без антител к группам антигенов из списка: p58, p39, BBK32)

ВНИМАНИЕ! В случае получения отрицательного или сомнительного результата по обоим классам (IgG и IgM) при подтверждении заболевания в начальной острой форме рекомендуется повторить исследование через 1 месяц.

Оценка результатов анализа контрольных образцов

К⁺Боррелиоз (или **К⁺Боррелиоз-Iyo**) – результат исследования считается достоверным, если получен положительный результат в соответствии с критериями интерпретации (Табл. 4 и 5) на наличие антител класса G (на канале Cy5/Red) и M

(на канале Cy3/Green).

K-Боррелиоз (или **K-Боррелиоз-Iyo**) – результат исследования считается достоверным, если значения специфической флуоресценции по двум каналам не превышают пороговых значений, установленных для K- для каждой серии набора и указанных во вкладыше или на CD-диске, прилагаемых к набору. Значения специфической флуоресценции отражаются в отчете получения и интерпретации результатов в ПО IMSTAR во вкладке **Контроль валидности K-**.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Набор реагентов с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «ИммуноЧип Боррелиоз» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н.Родионова

Директор
ФГБУ «НИИР» РАМН



Е.Л.Насонов