

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ООО "ЭКОлаб"



В. Ю. Борисов
2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Диагностикум для выявления антител классов М и G
к *Borrelia burgdorferi* в реакции иммунофлуоресценции»
«Боррелия-Флюороген-скрин»

Регистрационное удостоверение № _____ от _____ 2014г.

Комплект №2
«Диагностикум для выявления антител класса G
к *Borrelia burgdorferi* в реакции иммунофлуоресценции»
«Боррелия-Флюороген-IgG»

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и определение титра антител класса G к *Borrelia burgdorferi* в сыворотке крови человека в реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект	
		комплект 2/1	комплект 2/2
Антиген <i>Borrelia burgdorferi</i> на стекле предметном	инактивированный <i>Borrelia burgdorferi</i> , фиксированный в лунках предметных стекол для микроскопии, имеющих матовое гидрофобное тефлоновое покрытие	5 шт.	10 шт.
ФИТЦ-конъюгат-IgM	козьи антитела к IgG человека, меченные флюоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ); прозрачная жидкость с желтоватым оттенком	1 фл. 1,5 мл	1 фл. 2,8 мл
Контрольный положительный образец (K ⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к <i>Borrelia burgdorferi</i> в титре от 1:1280 до 1:40960 (титр указывается для каждой серии набора, содержание антител указывается на этикетке образца); инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	1 фл. 0,5 мл	1 фл. 0,5 мл
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	сыворотка крови человека, не содержащая антитела к <i>Borrelia burgdorferi</i> , инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	1 фл. 0,5 мл	1 фл. 0,5 мл
Концентрат отмывающего раствора [(OP)к]	прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. 40 мл.	2 фл. по 40 мл
Разводящий буферный раствор	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. 20 мл	2 фл. по 20 мл

РБР)			
Монтирующая жидкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл

Набор дополнительно укомплектован принадлежностями: вспомогательным ланшетом для предварительного разведения образцов - 1 шт. Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению (отдельная для каждого комплекта).

Запрещается использование предметных стекол с антигеном, контрольных образцов, ФИТЦ-конъюгата из разных серий наборов. Остальные реагенты могут быть использованы для всех постановок РИФ.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовые варианты комплектации рассчитаны на исследование 50 и 100 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 2 лунки). Возможно проведение раздельных исследований с использованием необходимого количества предметных стекол:

Число предметных стекол	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число иссл. обр.	1-8	9-18	19-28	29-38	39-48	49-58	59-68	69-78	79-88	89-98

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа.

При наличии в исследуемых образцах антител к *Borrelia burgdorferi* они связываются с антигеном на предметном стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются комплексы "антиген-антитело к *Borrelia burgdorferi* -антитело конъюгата", наличие которых определяется по флюоресценции (желто-зеленое свечение *Borrelia burgdorferi*) при просмотре стекол в люминесцентном микроскопе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуется сыворотка крови человека.

Не допускается исследование образцов с признаками липемии, гемолиза и желтухи, образцов с микробной контаминацией, образцов, подвергшихся многократному замораживанию и оттаиванию, поскольку могут возникнуть неспецифичные результаты.

Допускается исследование гепаринизированных образцов и образцов с ЭДТА.

Допускается исследование сыворотки крови, инактивированной прогреванием при 56°C в течение 30 минут.

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

Перед исследованием образцы могут храниться до 7 сут при температуре от 2 до 8 °C и до 3 мес при температуре минус 20 °C.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность комплекта набора определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, содержащих антитела класса G (СОП_G⁺-178), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность комплекта набора определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, не содержащих антитела класса G (СОП_G⁺-178), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

По данным клинических испытаний, проанализировано 394 образца (проб), из них:

В 133 пробах обнаружены антитела класса G к *Borrelia burgdorferi*;

В 261 пробах не обнаружены антитела класса G к *Borrelia burgdorferi*;

Воспроизводимость – 100%.

Таким образом, диагностическая чувствительность набора составила 98,284%,
диагностическая специфичность – 99,122% с доверительной вероятностью 90%.

Диагностический титр IgG-антител к *Borrelia burgdorferi* 1:160.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы

Цилиндр мерный.

Емкость Коплина или аналогичная для отмывки предметных стекол.

Микропробирки для разведения проб.

Предметные стекла (24х60 мм).

Микропипетки (10-1000мкм) с наконечниками.

Таймер.

Влажная камера (емкость с крышкой и с фильтровальной бумагой или марлей, смоченной водой, на дне).

Емкость полиэтиленовая для промывания с канюлей.

Микроскоп люминесцентный с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, фильтрами СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8 и ЖС-18.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

Спирт этиловый ректификованный (96 %).

Подготовка реагентов и материалов

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 20 до 25 °С.

Приготовление отмывающего раствора (ОР)

(ОР)_к интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °С в течение 30 мин до полного растворения солей).

Развести концентрат в 25 раз водой очищенной, для чего при использовании всех стекол набора:

40 мл (ОР)_к довести водой очищенной до 1 л,

80 мл (ОР)_к довести водой очищенной до 2 л.

При дробном использовании набора развести концентрат водой очищенной в 25 раз, используя объемы концентрата и воды, указанные в табл. 1 для заданного числа предметных стекол.

Таблица 1

Число предм. стекло	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(ОР) _к , мл	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
Вода очищ. мл	до 200	до 400	до 600	до 800	до 1000	до 1200	до 1400	до 1600	до 1800	до 2000

Допускается хранение раствора в течение 14 сут при температуре от 2 до 8 °С и до 7 сут при температуре от 18 до 25 °С.

Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы необходимо развести в 160 раз (диагностический титр) в РБР. Это удобнее делать в два этапа: сначала развести образец в 10 раз (например: к 90 мкл РБР добавить 10 мкл образца и тщательно перемешать пипетированием), а затем еще в 16 раз (например, к 150 мкл РБР добавить 10 мкл предыдущего разведения образца).

Разведенные образцы могут храниться при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

Подготовка других реагентов

Контрольные образцы, РБР, монтирующая жидкость, конъюгат готовы к применению.

Проведение анализа

Внимание!

Во время работы со стеклами допускается держать их только за маркированный участок или край. Не допускайте прикосновения к лункам!

Непосредственно перед постановкой проверить целостность вакуумной упаковки (использование стекол с нарушенной вакуумной упаковкой не допускается!), извлечь необходимое число стекол и промаркировать их.

1. Качественное исследование

Рекомендуемая схема постановки.

1 лунка – К ⁺
2 лунка – К ⁻
3-10 лунки – исследуемые образцы (разведенные 1:160)

1.1. Осторожно внести по 25 мкл контрольных и подготовленных исследуемых образцов в соответствующие лунки (полностью покрывая поверхность лунки и не касаясь кончиком пипетки поверхности стекла). Поместить предметные стекла во влажную камеру.

Инкубировать 30 мин при температуре 20-25 °С.

Внимание!

Не допускать пересыхания лунок во время инкубаций!

1.2. Осторожно, пользуясь емкостью для промывания с канюлей, один раз промыть предметное стекло ОР. Для предупреждения перекрестной контаминации избегайте промывания одной лунки через другую, промывайте, направляя струю ОР от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов и не фокусируя ее непосредственно на лунках.

После этого 3 раза промыть предметное стекло ОР в емкости Коплина или аналогичной, предназначенной для отмывки предметных стекол, выдерживая их в ОР при каждой промывке 5 мин и меняя ОР после каждой промывки. Предметное стекло при промывке должно быть полностью погружено в раствор.

Стряхнуть избыток ОР с предметного стекла, нижнюю сторону его осторожно протереть фильтровальной бумагой для удаления влаги.

1.3. В лунки предметного стекла внести по 25 мкл ФИТЦ-конъюгата.

Предметное стекло инкубировать 30 мин при температуре 20-25 °С в темноте во влажной камере.

1.4. Промыть стекло, как указано в п. 1.2. Нанести на предметное стекло по средней линии (между лунками) монтирующую жидкость, затем сверху осторожно положить покровное стекло, избегая возникновения под ним пузырьков воздуха и убрать излишки монтирующей жидкости фильтровальной бумагой. Провести микроскопию препарата под люминесцентным микроскопом при общем увеличении 400х-1000х.

Регистрация и учет результатов качественного исследования

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения *Borrelia burgdorferi* в поле зрения микроскопа, используя шкалу интенсивности, приведенную в табл. 2.

Таблица 2

Характер свечения	Запись результата
Максимально яркое (сверкающее) желто-зеленое свечение	(3+)-(4+)
Менее яркое желто-зеленое свечение	(2+)
Ясно различимое, но слабое желто-зеленое свечение	(1+)
Едва различимое свечение или его полное отсутствие	(-)

Примечание: Различные оптические системы могут давать различия в интенсивности свечения до 1+ и более, поэтому интенсивность свечения следует рассматривать только как ориентировочный показатель титра.

Наличие и интенсивность свечения в лунках с исследуемыми образцами можно оценивать только при соблюдении следующих условий:

Свечение в лунке с K^+ интенсивностью не ниже 3+ и полное отсутствие свечения в лунке с K^- .

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов:

Результат	Интерпретация
Более 70 % боррелий в поле зрения полностью или частично светятся с интенсивностью от (2+) до (4+)	Положительный результат (выявлены IgG антитела к <i>Borrelia burgdorferi</i>)
Более 70 % боррелий в поле зрения дают едва различимое свечение или его полное отсутствие (-)	Отрицательный результат (IgG антитела к <i>Borrelia burgdorferi</i> не выявлены). Наличие слабой неоднородной флюоресценции (в основном по краям тестового поля) считать также отрицательным результатом.
Все остальные варианты микроскопической картины	Сомнительный результат. Соответствующие образцы должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется мониторинг антителообразования у пациента, чтобы исключить возможные неспецифические или перекрестные реакции

Примечание:

Возможны перекрестные реакции со спирохетами, в частности с *Treponema pallidum*, что может привести к ложноположительным результатам. При подозрении на наличие трепонемных антител рекомендуется исследование образца в специфических тестах на сифилис (ИФА, РПГА, РИФ_{abc} или методом иммунного блоттинга).

2. Полуколичественное исследование (определение титра антител).

Проводится только с образцами, давшими положительный результат в качественном исследовании, с обязательным параллельным титрованием K^+ .

При исследовании парных сывороток рекомендуется титрование исследуемых образцов. Если интенсивность флюоресценции образца ниже интенсивности положительного контроля в качественном исследовании, разводите образец до титра, указанного на флаконе с положительным контролем. Если интенсивность флюоресценции выше интенсивности положительного контроля, то разводите образец на два разведения выше контрольного положительного образца.

Для титрования можно воспользоваться вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов.

В первые лунки всех рядов внести по 100 мкл соответствующих образцов, разведенных 1:160 (диагностический титр), во все остальные - по 50 мкл РБР.

Приготовить серийные двукратные разведения каждого образца, для чего в лунку 2 каждого ряда внести 50 мкл соответствующего образца, разведенного 1:160; перемешать и 50 мкл полученного разведения (1:320) внести в лунку 3; перемешать и перенести 50 мкл полученного разведения (1:640) в лунку 4 и т.д. до конечного разведения образца.(или титра К+).

Каждое из полученных разведений исследовать, как описано в разделе 1 (качественное исследование).

Титром исследуемого образца считать максимальное разведение, в котором будет получен положительный результат РИФ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности 1 год. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковки неиспользованные реагенты хранить в плотно закупоренной таре при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности набора.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества комплекта набора «**Боррелия-Флюороген-IgG**», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе



С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

«___» 06 НОЯ 2015 2015 г.



КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ (Боррелия-Флюороген-IgG)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Подготовка образцов	Образцы сыворотки крови развести РБР в 160 раз
Нанести	На лунки предметного стекла с фиксированным антигеном по 25 мкл подготовленных исследуемых и контрольных образцов
Инкубация	30 мин, 20-25 °С, во влажной камере
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина;
Нанести	На каждую лунку по 25 мкл ФИТЦ-конъюгата
Инкубация	30 мин, 20-25 °С, во влажной камере, в темноте
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина;
Нанести	Монтирующую жидкость, покровное стекло
Провести люминесцентную микроскопию (400х-1000х).	

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

ЛИСТ 7

Начальник ОНД ЗАО "Эко-Гашенко"

"18" 2015

