

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного
выявления
иммуноглобулинов
класса М к возбудителям
иксодовых
клещевых боррелиозов
(болезнь Лайма)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ЛаймБест – IgM

НАБОР РЕАГЕНТОВ

D-1454

«ЛаймБест-IgM» представляет собой набор, основой которого являются рекомбинантные антигены *Borrelia burgdorferi s.l.*, иммобилизованные на поверхности лунок полистиролового разборного планшета.

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотке или плазме крови человека специфические иммуноглобулины класса М к возбудителям боррелиоза за счёт их взаимодействия с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок стрипов. Образование комплекса «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

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

Один набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА, при каждой из которых 3 лунки используются для постановки контролей.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (*болезни Лайма*) в сыворотке или плазме крови человека и рекомендуется для ранней диагностики болезни Лайма в клинической практике.

2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *Borrelia burgdorferi s.l.* – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K⁺) – 1 фл., 0,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K⁻) – 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат (антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПП) – 1 фл., 3 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;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- плёнка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- одноразовые наконечники – 16 шт.;
- планшет разборный для предварительного разведения – 1 шт.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами 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 СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

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%.
- Желательно использовать свежееотобранные образцы сыворотки (*плазмы*) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°C не более 5 суток, либо при минус (20±3)°C, если необходимо более длительное хранение.
- Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин.
- Нельзя использовать проросшие, гемолизи-

рованные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25)°C не менее 30 мин.
- Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 минут до их использования.
- После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник (2-8)°C.
- 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 сек.
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости 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 стрипов 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 во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».
- Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.
- При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать **одноразовые** наконечники для дозаторов.
- Посуду (*ванночки*), используемую 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.

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												
Концентрированный раствор конъюгата, 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

3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Для приготовления рабочих реагентов необходимо пользоваться таблицей расхода компонентов на стр. 10.

3.1.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу, стр. 10) и развести его дистиллированной водой до указанного в таблице объема или содержимое одного флакона – до **700 мл**.

Хранение: при (2-8)°С до 5 суток.

3.1.2. Контрольные образцы

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют предварительного разведения.

3.1.3. Исследуемые образцы

Внимание! Для предварительного разведения использовать разборный планшет (промаркирован красным фломастером).

Исследуемые образцы предварительно развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС):

а) Отобрать необходимое количество стрипов для предварительного разведения (*красная маркировка*);

б) Внести в лунки по **90 мкл РПРС**;

в) Внести в лунки по **10 мкл исследуемых образцов**. Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (*пипетирование не менее 4 раз*), при этом происходит изменение окраски раствора.

Внимание! *Исследуемые образцы в предварительном разведении готовить непосредственно перед использованием.*

3.1.4. Растворы конъюгата

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

Приготовить **концентрированный раствор конъюгата** путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в **1 мл РПР** (при этом получается раствор насыщенного пурпурно-фиолетового цвета).

Хранение: *концентрированный раствор конъюгата – при (2-8)°С до 1 месяца.*

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

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

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК (*см. таблицу*), тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

3.1.5. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! *Раствор ТМБ готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!*

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ (*см. таблицу*), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать пипетированием.

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.

3.2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

3.2.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу тщательно упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°С до 1 месяца.

Приготовить промывочный раствор (п. 3.1.1), предварительно разведённые исследуемые образцы (п. 3.1.3), концентрированный раствор конъюгата (п. 3.1.4). Все растворы должны быть комнатной температуры (18-25)°С.

3.2.2. Во все лунки стрипов внести по **90 мкл** раствора для разведения сывороток (РС). В 1 лунку внести **10 мкл K⁺**, в 2 лунки – по **10 мкл K⁻**, во все остальные лунки – по **10 мкл** предварительно разведённых образцов, получая, таким образом, конечное разведение образцов 1:100. *Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 5 раз).*

Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать при 37°С **60 мин.**

За 5-10 мин до окончания инкубации при-

готовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 3.1.4).

3.2.3. По окончании инкубации содержащее лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором. *Каждую лунку необходимо заполнять полностью (вносить 400 мкл промывочного раствора).* Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки из лунок необходимо тщательно удалить влагу, постукивая перевёрнутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

3.2.4. Во все лунки внести по **100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.**

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

Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать при 37°С **30 мин.**

3.2.5. По окончании инкубации промыть стрипы 5 раз промывочным раствором и удалить влагу из лунок как описано выше (п. 3.2.3).

3.2.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 3.1.5).

Во все лунки внести по **100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении**.

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

Стрипы инкубировать в защищённом от света месте при (18-25)°С **25 мин**.

3.2.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по **100 мкл стоп-реагента** и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Внимание! Следует избегать попадания стоп-реагента (0,5 М H₂SO₄) на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

4. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность 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.

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значение ОП в лунках с K⁺ не менее 0,4;
- значение ОП в лунках с K⁻ не более 0,2.

Рассчитать критическое значение оптической плотности (ОП_{крит}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} \text{K}^- + 0,2,$$

где ОП_{ср} K⁻ – среднее значение ОП для K⁻.

Если ОП K⁻ имеет отрицательное значение, при расчёте считать её равной нулю.

Исследуемый образец расценивать как положительный, если значение ОП в соответствующей лунке равно или превышает ОП_{крит}.

Исследуемый образец расценивать как отрицательный, если значение ОП в соответствующей лунке не превышает ОП_{крит}.

Исследуемые образцы, дающие ОП в пределах «серой зоны» (ОП_{крит} ± 10%), требуют особого внимания. Такие образцы подлежат обязательному повторному анализу.

В случае воспроизведения результата в пределах «серой зоны», пациенты подлежат обязательному наблюдению в динамике.

При динамическом наблюдении пациента с целью получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации маркера в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор хранить и транспортировать при (2-8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Не допускать замораживания!

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;

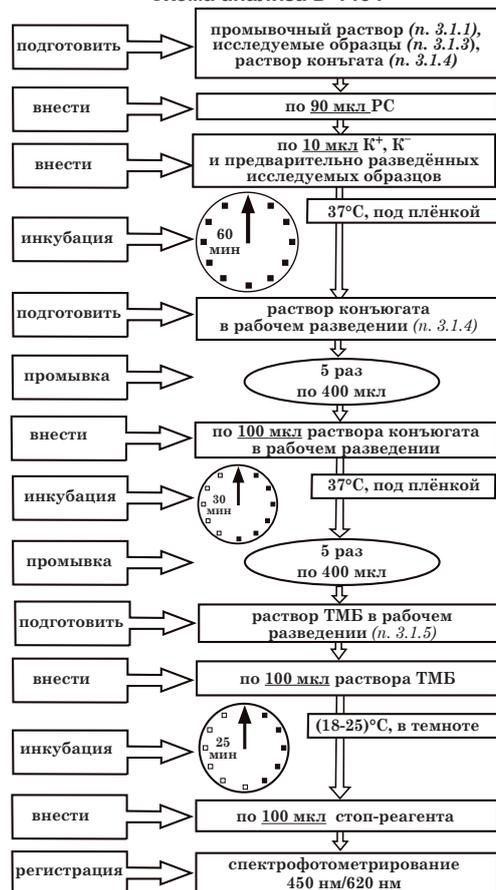
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

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

04.05.10

Схема анализа D-1454



**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@online.nsk.su

Internet: www.vector-best.ru