

НАБОР ИФА

ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ИЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ 14kDa + OspC BORRELIA BURGDORFERI

EIA-4288, Borrelia 14kD+OspC IgM ELISA

Каталог. № : EIA-4288
Количество : 96
Производитель: DRG(США)

Методика от 07-2012
Версия 7.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный анализ для качественного или количественного определения IgM антител к антигенам 14kDa + OspC Borrelia Burgdorferi в человеческой сыворотке, плазме и спинномозговой жидкости. Инфекции всех трех подвидов B. Burgdorferi (garrinii, afzelii и Sensu strictu) обнаруживаются.

2 ВВЕДЕНИЕ

Borrelia burgdorferi, бактерии спирохеты, это этиологический агент болезни Лайма (Боррелиоза), которая, на сегодняшний день является наиболее распространенным заболеванием в Европе и США, переносимым клещами (Ixodes sp.). Лайм-Боррелиоз - это системное заболевание с широким спектром клинических симптомов, которое развивается стадиями возрастающей остроты, подобно сифилису. Типичным симптомом острой фазы является ЕСМ (erythema chronicum migrans), часто сопровождаемая гриппозными симптомами. Поздние стадии заболевания могут характеризоваться артритом, кардитом, а так же неврологическими и дерматологическими проявлениями.

Лайм-Боррелиоз лечится антибиотиками на всех стадиях, однако чем раньше они применяются, тем больше шансов на излечение. Поэтому точный лабораторный диагноз Лайм-Боррелиоза, выявляющий заболевание на ранних стадиях, очень важен.

Антитела IgM обычно появляются через три недели после заражения, антитела IgM – через 4 -6 недель. Ранняя иммунная реакция в основном направлена против участка 14 kD белка бактериального жгутика и OspC (внешний поверхностный белок C) а затем распространяется на остальные бактериальные белки.

В Borrelia burgdorferi 14 kDa + OspC IgM ELISA, Borrelia burgdorferi – специфичная часть флагеллина (белок бактериального жгутика) используется как рекомбинантный белок для связывания антител. Результаты обширных сравнительных исследований ELISA, IFA и агглютинационным методом, так же как и Western Blot, показывают, что 14 kD IgM ELISA демонстрирует как достаточно высокую специфичность так и повышенную чувствительность к раннему иммунному ответу при лайм-Боррелиозе. Использование рекомбинантного белка как антигена в исследовании антител IgM проявляется в хорошем соотношении сигнал/шум (signal/noise ratio), позволяющим четко интерпретировать данные. OspC – классический очищенный внешний поверхностный белок C. Примерно в 5 % случаях инфекции ранний иммунный ответ направлен против OspC. Для обнаружения антител, направленных против этого белка, OspC был выбран как поверхностный антиген в тест-системе DRG Borrelia burgdorferi 14 kD + OspC ELISA.

Острая фаза обычно характеризуется высокими титрами антител IgM. Высокие титры IgM вместе с низкими или с отсутствием антител IgM бывают при ослабевающем Боррелиозе (благодаря терапии или спонтанно) или при хронической стадии. Так как в этих случаях так же требуется лечение, ELISA диагностика Borrelia IgM важна в особенности при подозрении на Боррелиоз, но Borrelia 14 kD + OspC IgM ELISA показывает отрицательный результат, как и проверка иммунного статуса.

В наборе для Borrelia IgM ELISA задействована высокоспецифичная смесь антигенов Borrelia burgdorferi sensu strictu, B. afzelii и B. garinii, поэтому методика определяет антитела IgM с высокой чувствительностью и специфичностью с самого иммунного ответа антител IgM. Титры антител незначительно снижаются через 2-4 месяца после излечения от инфекции.

3 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Твердофазный иммуносорбентный анализ ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) основан на принципе сэндвича. Лунки покрыты антигенами. Специфические антитела образца, связанные с покрытыми антигенами лунками, определяются вторичными, конъюгированными ферментом антителами (E-Ab), специфичными к IgM человека. После реакции субстрата плотность полученного цвета пропорциональна количеству определенных специфических антител IgM. Результаты образцов можно определить с помощью индекса Cut-off.

4 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для диагностики in-vitro. Только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа внимательно прочитайте инструкцию, прилагаемую к набору. За более полной информацией (клинические исследования, test performance, automation protocols, alternative applications, literature, etc.) обратитесь к поставщику.
3. В случае серьезного повреждения набора, свяжитесь с компанией DRG или с вашим поставщиком в письменной форме не позже одной недели после приобретения набора. Не используйте поврежденные препараты для исследований. Поврежденные препараты необходимо хранить на случай рекламации.
4. Обращайте внимание на номер лота и срок хранения. Не используйте реагенты из разных наборов.
5. Соблюдайте меры предосторожности. Проводить анализ рекомендуется в соответствующей специальной медицинской одежде, одноразовых перчатках и защитных очках в случае необходимости.
6. Реагенты данного набора, содержащие опасные материалы, могут вызвать раздражение кожи и глаз. См. прилагаемую инструкцию (MATERIALS SUPPLIED) и ярлык производителя. Имеется в наличии паспорт безопасности данных для данного набора.
7. В соответствии с правилами национальной безопасности, с химическими продуктами и использованными для анализа реагентами необходимо обращаться как с опасными веществами.
8. Избегать контакта со Стоп раствором. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
9. Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы и определены как отрицательные для HIV I/II, HBsAg and HCV. Однако, наличие тех или иных инфекционных компонентов не может быть исключено полностью, следовательно, реагенты необходимо рассматривать как потенциальную биологическую угрозу.

5 ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ

Набор необходимо хранить при температуре 2-8°C. Беречь от попадания прямых солнечных лучей и тепла. Хранение и стабильность образцов и реагентов описаны далее в соответствующих главах.

Микротитровальный планшет хранится до трех месяцев во вскрытой, но плотно закрытой упаковке при температуре 2-8°C.

6 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотка, плазма (ЭДТК)

Необходимо соблюдать обычные меры предосторожности при венепункции. (Обычные меры предосторожности должны соблюдаться при венепункции). Важно сохранить образец крови химически чистым с момента пункции до проведения анализа. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или сильно липемические образцы. Перед проведением тестирования, мутные образцы крови необходимо центрифугировать, для удаления осадка.

Хранение Сыворотка/Плазма/СМЖ:	2-8°C	≤ -20°C (аликвоты)	Беречь от попадания прямых солнечных лучей и тепла. Не допускать повторного замораживания.
Стабильность Сыворотка/Плазма/СМЖ:	5 дней	12 месяцев	

7 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Количество	Символ	Компонент
1 x 12 x 8	MTP	Микротитровальный планшет Делимые стрипы, покрытые специфическими антигенами.
1 x 12 мл	ENZCONJ	Ферментный конъюгат Готов к использованию. Зеленого цвета. Содержит анти-человеческий IgM, конъюгированный пероксидазой.
1 x 4 x 1.5 мл	CAL A-D	Стандарты A-D 2; 10; 25; 100 Ед/ мл Стандарт В = Стандарт Cut-off Готовы к использованию. Содержат: IgM антитела к В. Burgdorferi, стабилизаторы.
1 x 1.5 мл	CONTROL +	Положительный контроль Готов к использованию. Содержит IgM антитела к В. burgdorferi, stabilizers.
1 x 1.5 мл	CONTROL -	Отрицательный контроль Готов к использованию. Содержит сыворотку человека, стабилизаторы.
1 x 100 мл	DILBUF	Буфер для разведения Готов к использованию. Голубого цвета.
1 x 100 мл	WASHBUF	Концентрат промывочного буфера (10x) Содержит фосфатный буфер, стабилизаторы.
1 x 12 мл	TMB SUBS	Раствор субстрата ТМВ Готов к использованию. Содержит ТМВ, стабилизаторы
1 x 12 мл	TMB STOP	ТМВ Стоп-раствор Готов к использованию. 1 М H ₂ SO ₄ .

8 ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропипетки (Мультипипетка Ерпендорф или аналог, < 3% CV). Объем: 5; 10; 100; 1000 мкл (регулируемые)
2. Вortexный миксер
3. Пробирки с делениями (≥ 1 мл) для разведения образцов
4. Инкубатор, 37°C
5. 8-канальная микропипетка с резервуарами для реагентов
6. Промывочная емкость, автоматическая или полуавтоматическая система промывки лунок (вошер)
7. Микропланшетный ридер с возможностью считывания на длине волны 450 нм (сравнительная длина волны 600-650 нм)
8. Бидистиллированная или деионизированная вода
9. Бумажные полотенца, наконечники для пипеток и таймер

9 ЗАМЕЧАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ПРОЦЕДУРЫ

1. Любое неточное обращение с образцами или изменение процедуры анализа могут повлиять на результаты. Указанные дозы, инкубационный период, температура и подготовка к процедуре должны проводиться согласно прилагаемой инструкции. Используйте только калиброванные пипетки и приборы.
2. Рекомендуется проводить процедуру непрерывно. Убедитесь, что все необходимые реагенты, материалы и приборы готовы к использованию. Довести реагенты и образцы до комнатной температуры (18-25 °C) и перед использованием аккуратно встряхнуть (вращающими движениями) каждый флакон с жидкими реагентами и образцами. Смешать реагенты так, чтобы не образовалась пена.
3. Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца. Не перепутайте крышки, закрывайте не использованные тубики. Не рекомендуется использовать реагенты, лунки и пробирки вторично.
4. Некоторые компоненты содержат ≤ 250 мкл раствора. Перед тем, как открыть флакон, убедитесь, что весь раствор находится на дне.
5. Используйте метод пипетирования, чтобы контролировать положение планшеты.
6. Время инкубации так же влияет на результаты. Все лунки должны быть расположены последовательно. Для анализа лучше использовать 8 канальную микропипетку для раскапывания раствора в лунки.
7. Необходимо хорошо промывать микропланшету. Плохо вымытые лунки приведут к ошибочным результатам. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку или автоматическую систему промывки лунок. Не давайте лункам засохнуть в период между инкубациями. Не повредите лунки во время промывания. Аккуратно промойте. Убедитесь, что в лунках не осталось осадка, и они все заполнены.
8. Накрытые лунки, пробирки попадают под воздействие влажности. Не открывайте упаковку, пока она не достигнет комнатной температуры. Не использованные лунки, пробирки необходимо сразу же извлечь из пакета с влагопоглотителем.

10 ИНСТРУКЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Приготовление лиофилизированных или концентрированных реагентов

Развести	Компонент	с	Материал для разведения	Соотношение	Замечания	Хранение	Стабильность
100 мл	Промывочный буфер	1000 мл	бидист. вода	1:10	кристаллы растворить при 18-25°C	2-8°C	2 месяца

10.2 Разведение образцов

10.2.1 Сыворотка, плазма

Образец	Развести	с	Соотношение	Замечания
Сыворотка, плазма	обычно	Буфером для растворения	1:101	Например, 10 мкл + 1 мкл

Образцы с высокой концентрацией необходимо еще раз развести.

10.2.2 Сыворотка/СМЖ

Для диагностирования спинномозговой жидкости (CSF) по Reiber, необходимо использовать примерно одинаковые концентрации или индексы Cut-off (COI) в ОП диапазоне от 1.0 до 0,1 для сыворотки и СМЖ. Это обычно обеспечивается с помощью следующих разведений:

Образец	Развести	с	Соотношение	Замечания
Сыворотка	обычно	Буфером для растворения	1:401	Например, 5 мкл + 2 мкл
СМЖ	обычно	Буфером для растворения	1:4	50 мкл + 150 мкл

Индексы Cut-off корректируются факторами разбавления каждого разведения по отношению к разбавлению 1:101.

Индекс Cut-off для разбавления сыворотки 1:401 нужно умножить на 4 и разбавление CSF 1: 4 должно быть разделено на 25.

Ряд разведений должен быть выполнен, если результаты испытаний образцов не в пределах от 1.0 до 0.1 OD. Следующие разведения рекомендуются:

Сыворотка	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
СМЖ	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

	Не обрабатывать IgM образцы с РФ-Абсорбентом, так как РФ-Абсорбент изначально является составляющей Буфера для Разведений. Время, затраченное на распределение образцов, не должно превышать 15-20 минут.
---	--

11 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1.	Пипетировать 100 мкл каждого Стандарта, Контроля и разбавленного образца в соответствующие лунки микротитровального планшета. В качественном тесте только Стандарт В (Стандарт Cut-off) используется.
2.	Инкубировать 1 час при 37°C. Используйте крышку или влажный сосуд.
3.	Удалить клейкую фольгу. Вылить инкубационный раствор. Промыть планшет 3 раза 300 мкл разведенного Промывочного буфера . Извлечь избыток раствора, выстучав перевернутый планшет на бумажное полотенце.
4.	Раскапать 100 мкл Ферментного конъюгата в каждую лунку.
5.	Инкубировать 30 минут при 37°C. Используйте крышку или влажный сосуд.
6.	Удалить клейкую фольгу. Вылить инкубационный раствор. Промыть тарелку 3x300 мкл разведенного Промывочного буфера . Извлечь избыток раствора, вынимая перевернутую тарелку на бумажное полотенце.
7.	Для раскапывания Субстрата и Стоп-раствора использовать 8-канальную пипетку. Пипетирование должно проводиться одновременно как для субстрата так и для Стоп раствора. Избегать образования пузырьков воздуха.
8.	Пипетировать 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.
9.	Инкубировать 30 минут при КТ в темноте.
10.	Остановить реакцию, добавив в каждую лунку 100 мкл ТМВ Стоп раствора . Смешать содержимое, аккуратно встряхивая планшет.
11.	Измерять оптическую плотность with a photometer at 450 нм (предпочтительно 600-650 нм) в течение 60 минут после пипетирования Стоп раствора.

12 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты теста можно считать действительными в том случае, если анализ был проведен в соответствии с инструкциями. Более того, необходимо строго следовать правилам GLP (Good Laboratory Practice) или же другим стандартам. Значения всех стандартов и контролей должны быть в пределах приемлемых диапазонов, указанных в сертификате качества. В противном случае результат анализа считается не действительным. Каждая лаборатория должна использовать образцы с известными концентрациями в качестве контролей.

В случае любого отклонения от нормы, необходимо проверить следующее: Срок годности реагентов, условия хранения, пипетки, приборы, условия инкубации и методы промывки.

13 ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка теста может быть выполнена качественно или количественно.

13.1 Качественная оценка

Значение Cut-off выражается оптической плотностью (OD) Стандарта В (Cut-off стандарта). Индекс Cut-off (COI) рассчитывается из средних оптических плотностей образца и значения Cut-off. Если оптическая плотность образца находится в пределах 10 % значения Cut-off (серая зона), образец принимать как сомнительный. Образцы со значениями, выше Cut-off, считать положительными, ниже – отрицательными.

Типичный пример

Cut-off = ОП (Стандарт В, Cut-off Стандарт) = 0.45

ОП Образца = 0.60

Индекс Cut-off (COI): $0.60/0.45 = 1.33$. Образец можно считать положительным.

13.2 Количественная оценка

Полученный ОП стандартов (ось, линейных) показаны в зависимости от их концентрации (ось x, логарифмической) либо на полулогарифмической миллиметровой бумаге или с использованием автоматизированного метода. Хорошо подходит снабжен кубического сплайна, 4 параметра Логистические или логит-Log.

Для расчета стандартной кривой, применять каждый сигнал стандартов (один очевидный выброс дубликатов может быть опущен и более правдоподобным одно значение может быть использован).

Концентрацию образцов можно считать из стандартной кривой.

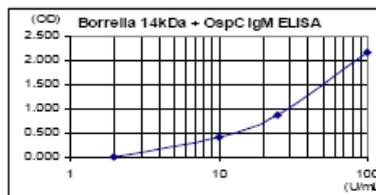
Начального разбавления было принято во внимание при ознакомлении с результатами от графика. Результаты образцов высших предварительного разбавления должны умножить на фактор разведения.

Образцы, показывающие концентрации выше самого высокого стандарта можно разбавить, как описано в предварительном испытании, инструкции по установке и исследовать повторно.

Типичная Калибровочная кривая

(Пример. Не использовать для расчетов!)

Standard	U/mL	OD Mean
A	2	0.011
B	10	0.414
C	25	0.856
D	100	2.167



14 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод	Диапазон	Интерпретация
Количественный (Стандартная кривая):	> 11 Ед/мл	Положительный
	9-11 Ед/мл	Сомнительный
	< 9 Ед/мл	Отрицательный
Качественный	> 1.1	Положительный

Только результаты не могут быть основой для медицинского заключения. Они должны рассматриваться совместно с другими клиническими наблюдениями и диагностическими

(Индекс Cut-off, COI)	0.9-1.1	Сомнительный
	< 0.9	Отрицательный

тестами.

В случае IgM отрицательных результатов с отрицательным значением IgG острый Боррелиоз маловероятен. Однако же, нельзя полностью исключать возможность возникновения новой инфекции, если образец был взят в течение меньше чем трех недель после инфекции, так как никакие специфичные антитела за этот период времени сформироваться не могут. Если образец положительный на IgM, результат указывает на острый Боррелиоз в ранней стадии, требующий терапии.

IgM результаты с пограничным значением, сопровождающиеся отрицательным результатом IgG, могут возникнуть в поздней стадии или же при хронической инфекции, так же как и стимулирование поликлональных антител другими инфекциями. Поликлональное стимулирование может быть исключено анализом Western Blot этих образцов с использованием разрушенных ультразвуком Боррелий. Предельные значения результатов должны быть подтверждены последующим контролем в течение 14 дней. В случае Боррелиоз IgM титры были бы постоянными за такой короткий период времени, тогда как в случае поликлональной иммунной реакции, титры обычно уменьшаются за этот период времени.

IgM положительные значения с соответствующими отрицательными IgG результатами указывают на острую инфекцию, требующую терапии. IgM положительные результаты, с положительными или пограничными IgG результатами указывают на острую инфекцию.

Borrelia 14kDa + OspC IgM ELISA высоко чувствителен и специфичен к инфекции Borrelia burgdorferi из-за использования специальных смесей антигенов Borrelia burgdorferi sensu strictu, B. afzelii и B. garinii. Таким же образом можно точно определить наличие хронической инфекции.

Borrelia 14kDa + OspC IgM ELISA так же подходит для последующего контроля и терапии. В этом случае необходимо учитывать тот факт, что титры антител значительно не меняются в течение 2 – 4 месяцев после того, как инфекция вылечена.

Результаты исследований не должны являться единственной причиной для любых терапевтических последствий. Эти результаты необходимо соотнести с другими медицинскими наблюдениями и диагностическими тестами.

15 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Забор образцов значительно влияет на результаты исследования. (См. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ). Для перекрестных реакций, см. характеристику.

Азид и Тимеросал с концентрацией более 0.1 % влияют на анализ и могут привести к недостоверным результатам.

Следующие компоненты крови значительно не влияют на результаты анализа вплоть до указанных концентраций:

Гемоглобин	2.0 мг/мл
Билирубин	0.3 мг/мл
Триглицерид	2.5 мг/мл

16 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность (Перекрестная Реактивность)	Группа пациентов	Отрицательные результаты/ тестируемые образцы	
	Lues (Treponema pallidum)	8/8	
	Rubella IgM положительный	7/9	
	Parvovirus IgM положительный	18/19	
	Measles IgM положительный	8/8	
	CMV IgM/IgG положительный	8/8	
	HSV IgM/IgG положительный	8/8	
	VZV IgM положительный	15/18	
EBV IgM положительный	6/8		
Точность	Intra-Assay n=20	Диапазон COI (Ед/мл)	CV (%)
		< 1 / < 10	4.4
	Inter-Assay n=20	> 1 / > 10	1.3
		0.3 / 3.3	9.9
		0.5 / 5	8.3
2.8 / 35	4.3		
5.2 / 89	6.6		
Линейность	Диапазон (OD)	Серийный диапазон разведения	Диапазон (%)
	2.0 - 0.3	1:1 – 1:16	80 - 120
Сравнение методов ИФА и Вестерн Блот	Относительная чувствительность	100 %	
	Относительная специфичность	> 95 %	
Автоматизация	Данный тест был оценен в сравнении с, например, BEPIII (Dade Behring), TRITURUS (Grifols)		

Исследование СМЖ	ИФА по исследованию IgM, специфических для болезни Лайма, проводился с использованием сыворотки и СМЖ, которые разводили 5 раз соответствующим образом: Сыворотка 1:100 - 1:600 и СМЖ 1:2 – 1:32. Парные образцы Сыворотки/СМЖ были взяты в один день и анализ основывался на использовании программы по оценке диагностики СМЖ, разработанной проф. Рейбером. Все результаты ИФА DRG соответствовали клиническим симптомам и контрольным тестовым результатам.
-------------------------	---



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com