



**ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯ
НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО
ВИЯВЛЕННЯ IgG АНТИТІЛ ДО АНТИГЕНІВ
Borrelia burgdorferi sensu lato
В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ**

«*Borrelia burgdorferi* IgG – ІФА»

НОМЕР ЗА КАТАЛОГОМ REF **K118G**



На 96 визначень



Для *in vitro* діагностики

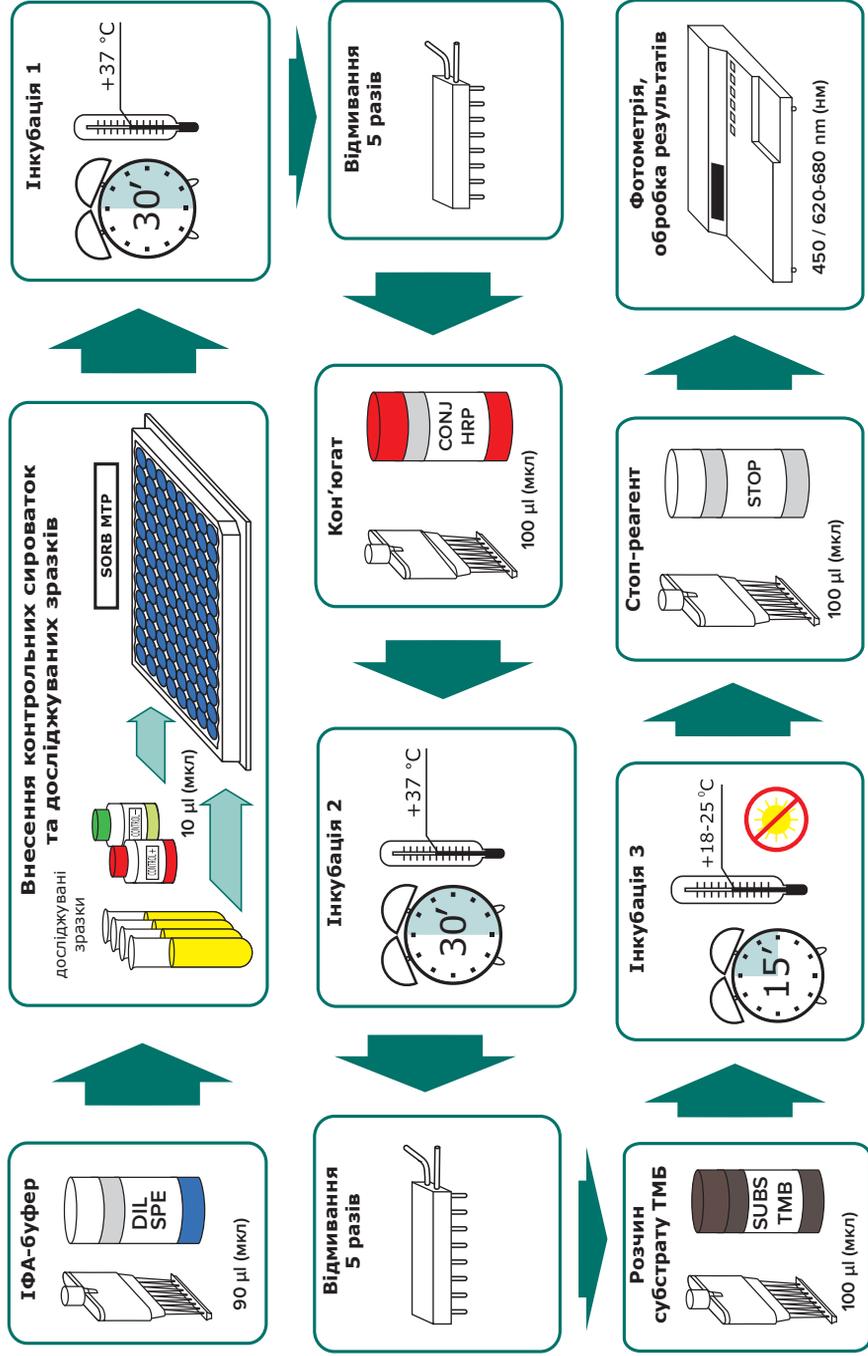


ТОВ «ХЕМА»
03179, м. Київ, а/с 49
вул. Академіка Єфремова, 23
+38 044 422-62-16
info@xema.com.ua
www.xema.com.ua



Уповноважений представник в ЄС:
Polmed.de Беата Розвадовська
Фіхтенстр. 12А, 90763 Фюрт, Німеччина
+ 49 911 931 639 67
info@polmed.de
www.polmed.de

Схема проведення аналізу



Увага! При кожній постановці аналізу обов'язково використовуйте контрольні сироватки.

K118G

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ	2
3. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ДЛЯ РОБОТИ З НАБОРОМ	5
6. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ	5
7. УМОВИ ЗАБОРУ, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ	6
8. УМОВИ ТРАНСПОРТУВАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ НАБОРУ ТА УТИЛІЗАЦІЯ ВІДХОДІВ	6
9. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	7
10. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
11. КОНТРОЛЬ ДОСТОВІРНОСТІ ТА ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	8
12. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	9
13. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ	9
14. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ	10
15. ЛІТЕРАТУРА	10
БЛАНК ВНЕСЕННЯ ЗРАЗКІВ	11

**ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯ
НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЯВЛЕННЯ IgG
АНТИТІЛ ДО АНТИГЕНІВ
Borrelia burgdorferi sensu lato
В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ
«*Borrelia burgdorferi* IgG – ІФА»**

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «*Borrelia burgdorferi* – ІФА» призначений для якісного виявлення IgG антитіл до *Borrelia burgdorferi sensu lato* в сироватці (плазмі) крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Область застосування - клінічна лабораторна діагностика.

2. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Borrelia burgdorferi sensu lato – це група збудників бореліозу або хвороби Лайма, поширена інфекція, основним господарем і переносником якої є іксодові кліщі. Захворювання передається лише трансмісивним шляхом при укусі кліща.

На ранніх стадіях бореліозу можуть спостерігатися втома, озноб, головний біль, пізніше можуть виникнути більш серйозні симптоми, такі як біль у суглобах, менінгіт, оніміння кінцівок, параліч лицьового нерва, розлад пам'яті, а також ураження очей та серця. Після проникнення спірохети у шкіру виникає повзуча еритема, після кількох днів або тижнів гематогенним або лімфогенним шляхом досягає багатьох органів. У загальному інкубаційний період складає від 3 до 45 днів.

Рання діагностика хвороби базується на клініко-епідеміологічних даних. Діагноз підтверджують лабораторними, як правило, серологічними методами – виявленням у крові специфічних антитіл до *Borrelia burgdorferi*.

IgM-антитіла з'являються у крові першими, через кілька днів після зараження, однак виявити їх лабораторними тестами можна через 2-3 тижні. Приблизно через 6 тижнів концентрація антитіл досягає максимуму і потім поступово зменшується. Антитіла IgG починають виявлятися на 4–6 тижні після інфікування, максимальна кількість IgG-антитіл синтезується через 2–3 місяці після появи ранніх симптомів захворювання. Потім їхня кількість поступово знижується, але вони залишаються в організмі протягом декількох років.

3. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Виявлення IgG-антитіл до *Borrelia burgdorferi* у сироватці (плазмі) крові ґрунтується на використанні непрямого варіанту твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовано рекомбінантний антиген *Borrelia burgdorferi*. Процедура проведення аналізу включає три етапи інкубації:

- під час першого етапу специфічні до *Borrelia burgdorferi* антитіла у досліджуваному зразку зв'язуються з антигенами на поверхні лунки;

- під час другого етапу антивидові моноклональні анти-IgG антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, зв'язуються з утвореними на попередньому етапі комплексами антиген-антитіло;

- під час третього етапу відбувається візуалізація утворених комплексів в результаті реакції з хромогеном 3,3',5,5'-тетраметилбензидином.

Після зупинки реакції стоп-розчином здійснюється вимірювання інтенсивності забарвлення лунок планшета. Отримані значення прямо пропорційні концентрації IgG антитіл до *Borrelia burgdorferi* у досліджуваному зразку сироватки (плазми) крові.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Найменування	Об'єм	К-ть шт.	Опис
P118GZ	SORB MTP	Планшет	-	1	96-лунковий полістироловий стрипований планшет, в лунках якого засорбовано рекомбінантний антиген <i>Borrelia burgdorferi</i> , готовий до використання
CN118GZ	CONTROL -	Негативна контрольна сироватка К-	0,5 ml (мл)	1	Розчин на основі сироватки крові людини, що не містить IgG-антитіл до <i>Borrelia burgdorferi</i> , з консервантом, готовий до використання (рідина жовтого кольору)
CP118GZ	CONTROL +	Позитивна контрольна сироватка К+	0,2 ml (мл)	1	Розчин на основі сироватки крові людини з відомим вмістом IgG-антитіл до <i>Borrelia burgdorferi</i> , з консервантом, готовий до використання (рідина червоного кольору)
T118GZ	CONJ HRP	Кон'югат	12 ml (мл)	1	Розчин моноклональних антитіл до IgG людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, готовий до використання (рідина червоного кольору)
SP118GZ	DIL SPE	ІФА-буфер	12 ml (мл)	1	Буферний розчин з консервантом, готовий до використання (рідина фіолетового кольору)
R055Z	SUBS TMB	Субстрат	12 ml (мл)	1	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ), готовий до використання (прозора безбарвна рідина)
S008Z	BUF WASH 26X	26x концентрат розчину для відмивання	30 ml (мл)	1	Буферний розчин з детергентом, 26x концентрат (прозора безбарвна рідина)
R050Z	STOP	Стоп-реагент	12 ml (мл)	1	5,0% розчин сірчаної кислоти, готовий до використання (прозора безбарвна рідина)

До складу набору також входять інструкція із застосування, паспорт контролю якості та плівка для заклеювання планшета (2 шт).

5. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ДЛЯ РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 nm (нм) та 620-680 nm (нм);
- термостат, що підтримує температуру $+37\pm 1^\circ\text{C}$;
- автоматичний промивач планшетів (рекомендовано);
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 5-1000 μl (мкл);
- циліндр мірний об'ємом 1000 ml (мл);
- вода дистильована або деіонізована;
- таймер;
- засоби індивідуального захисту;
- папір фільтрувальний.

6. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

З метою запобігання некоректним результатам суворо дотримуйтесь рекомендованої послідовності та тривалості процедури проведення аналізу.

6.1. Набір реагентів призначений для професійного використання в *in vitro* діагностиці і може використовуватись виключно кваліфікованим персоналом.

6.2. При використанні набору необхідно дотримуватися наступних правил:

- не використовуйте набір після закінчення терміну придатності;
- не використовуйте набір у пошкодженій упаковці;
- з метою запобігання контамінації кожного разу використовуйте новий наконечник дозатора для внесення досліджуваних зразків та реагентів;
- використовуйте тільки верифіковане обладнання;
- після використання реагенту закривайте кожен флакон відповідною кришкою;
- не використовуйте компоненти інших наборів або реагенти інших виробників;
- не дозволяйте лункам планшета висохнути після етапу промивання, негайно переходьте до наступного етапу;
- уникайте утворення бульбашок при додаванні реагентів.

УВАГА! Розчин субстрату ТМБ є світлочутливим. Уникайте тривалої експозиції компоненту на світлі.

6.3. Деякі компоненти набору, такі як стоп-реагент, субстрат ТМБ та розчин для відмивання, можуть спричинити токсичну або подразнюючу дію. При потрапленні їх на шкіру або слизові оболонки слід промити уражену ділянку великою кількістю проточної води.

6.4. При роботі з набором необхідно користуватися засобами індивідуального захисту, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфекційний матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної та бактеріальної інфекції.

6.5. Контрольна сироватка та калібрувальні проби, що входять до складу набору, негативні на антитіла до ВІЛ 1,2, вірусу гепатиту С та HBsAg, однак реагенти слід розглядати як потенційно інфекційний матеріал і поводитись з ними обережно.

6.6. Не дозволяється їсти, пити, палити або використовувати косметику в лабораторії проведення аналізу.

7. УМОВИ ЗАБОРУ, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

7.1. Забір крові слід проводити з ліктьової вени одноразовою голкою за допомогою вакуумної системи забору крові. Зразки сироваток чи плазми крові повинні бути чітко промарковані та ідентифіковані. Сироватку крові необхідно відокремити від згустку якомога раніше, щоб уникнути гемолізу еритроцитів. При наявності будь-яких видимих частинок у зразку їх слід видалити центрифугуванням при 3000-5000 об/хв протягом 20 хвилин за кімнатної температури або фільтрацією.

Не слід використовувати зразки з високою ліпідемією, гемолізом, оскільки вони можуть дати хибні результати аналізу.

7.2. Зразки можна зберігати за температури +2...+8°C не довше 3 діб. Для більш тривалого зберігання помістити сироватку (плазму) крові до морозильної камери -15°C; не допускається повторне розморожування-заморожування.

7.3. Для транспортування зразків необхідно використовувати потрібне пакування. Первинна упаковка – це промаркована пробірка, що містить зразок. Вторинна упаковка – поліетиленовий пакет, який герметично закривається на замок zip-lock. Зовнішня упаковка – термоізолюючий контейнер, при цьому вторинну упаковку поміщають у зовнішню упаковку для транспортування в центрі термоконтейнера. Заморожені холодоагенти розміщують на дно, вздовж бокових стінок термоконтейнера та покривають ними зразки.

8. УМОВИ ТРАНСПОРТУВАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ НАБОРУ ТА УТИЛІЗАЦІЯ ВІДХОДІВ

Інформація про особливості умов зберігання, транспортування набору та утилізації відходів повинна враховуватись усіма особами, які беруть участь у цих процесах.

8.1. Транспортування

Набір реагентів «Borrelia burgdorferi IgG – ІФА» слід транспортувати в упаковці виробника за температури +2...+8°C. Допускається одноразове транспортування набору за температури до +25°C не довше 5 діб. Набори, транспортовані з порушенням температурного режиму, застосуванню не підлягають.

8.2. Зберігання

Набір реагентів «Borrelia burgdorferi IgG – ІФА» повинен зберігатися в упаковці підприємства-виробника за температури +2...+8°C. За таких умов зберігання набір буде стабільним протягом усього терміну придатності. Не допускається заморожування набору.

Набір розрахований на проведення 96 визначень з урахуванням контрольних сироваток.

У випадку часткового використання набору компоненти слід зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно щільно закрити на замок zip-lock у пакеті з силікагелем та зберігати за температури +2...+8°C не довше 2 місяців;
- ІФА-буфер, розчин субстрату ТМБ, стоп-реагент та концентрат розчину для відмивання після відкриття флаконів зберігати щільно закритими за температури +2...+8°C протягом усього терміну придатності набору;
- контрольні сироватки та кон'югат після відкриття флаконів зберігати щільно закритими за температури +2...+8°C протягом 2 місяців;
- готовий розчин для відмивання можна зберігати за кімнатної температури (+18...+25°C) не довше 5 діб або за температури +2...+8°C не довше 14 діб.

Набори, що зберігалися з порушенням регламентованого режиму, застосуванню не підлягають.

8.3. Утилізація

Компоненти набору, термін придатності яких закінчився, використані реагенти та матеріали, а також залишки зразків сироваток необхідно інактивувати та утилізувати відповідно до законодавчих вимог.

9. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

9.1. Перед проведенням аналізу компоненти набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати за кімнатної температури (+18...+25°C) не менше 30 хвилин.

9.2. Підготовка планшета

Відкрити пакет із планшетом і встановити у рамку необхідну кількість стрипів. Невикористані стрипи помістіть назад до пакету з силікагелем та щільно закрийте на замок zip-lock з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета.

9.3. Приготування розчину для відмивання

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання 30 ml (мл) додати до 750 ml (мл) дистильованої або деіонізованої води та ретельно перемішати. У разі часткового використання набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести в 26 разів дистильованою або деіонізованою водою. Витрати компонентів наведені нижче у таблиці:

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Об'єм концентрату розчину для промивання, ml (мл)	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25	27,5	30
Об'єм води, ml (мл)	62,5	125	187,5	250	312,5	375	437,5	500	562,5	625	687,5	750

10. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- 10.1. Помістіть у рамку планшета необхідну кількість стрипів із розрахунку на кількість досліджуваних зразків та 4 лунки для контрольних сироваток (1 лунка для позитивної контрольної сироватки (CP) та 3 лунки для негативної контрольної сироватки (CN)).
- 10.2. Внесіть у всі лунки планшета **по 90 µl (мкл) ІФА-буфера**.
- 10.3. Внесіть у лунки планшета **по 10 µl (мкл) контрольних сироваток та по 10 µl (мкл) досліджуваних зразків** сироватки (плазми) крові (SAMP) за Схемою, наведеною нижче. Внесення контрольних сироваток та досліджуваних зразків необхідно провести протягом 5 хвилин.

Увага! При кожній постановці аналізу обов'язково використовуйте контрольні сироватки.

Схема внесення зразків

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	SAMP5	SAMP13	SAMP21								
B	CN	SAMP6	SAMP14	SAMP22								
C	CN	SAMP7	SAMP15	SAMP23								
D	CN	SAMP8	SAMP16									
E	SAMP1	SAMP9	SAMP17									
F	SAMP2	SAMP10	SAMP18									
G	SAMP3	SAMP11	SAMP19									
H	SAMP4	SAMP12	SAMP20									

- 10.4. Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами по горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте протягом **30 хвилин за температури +37°C**.
- 10.5. Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки **5 разів** за допомогою автоматичного промивача або 8-ми каналного дозатора. При кожному відмиванні додайте у всі лунки по 300 μl (мкл) розчину для відмивання (див. п.9.3), а потім видаліть рідину за допомогою аспірації або декантування. Залишковий об'єм розчину для відмивання у лунках після кожної аспірації або декантування повинен складати не більше 5 μl (мкл). По закінченні відмивання ретельно видаліть залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір. Для автоматичного промивача/аналізатора об'єм розчину для відмивання може бути збільшений до 350 μl (мкл).
- 10.6. Внесіть у всі лунки по **100 μl (мкл) кон'югату**.
- 10.7. Заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета та інкубуйте протягом **30 хвилин за температури +37°C**.
- 10.8. По закінченні інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки **5 разів**, як описано в п. 10.5.
- 10.9. Внесіть у всі лунки по **100 μl (мкл) розчину субстрату ТМБ**. Внесення субстрату у лунки необхідно здійснити протягом 2-3 хвилин. Інкубуйте планшет у темряві **за кімнатної температури (+18...+25°C) протягом 15 хвилин**.
- 10.10. Внесіть у всі лунки у тій же послідовності, що і розчин субстрату ТМБ, по **100 μl (мкл) стоп-реагенту**. Після внесення стоп-реагенту вміст лунок забарвлюється в жовтий колір.
- 10.11. Визначте величину оптичної густини (ОГ) у лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 nm (nm) і референс світлофільтри 620–680 nm (nm). Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 5 хвилин після внесення стоп-реагенту.

11. КОНТРОЛЬ ДОСТОВІРНОСТІ ТА ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

11.1. Результати аналізу вважаються достовірними, якщо:

- ОГ негативної контрольної сироватки не вище 0,15 у всіх лунках;
- ОГ позитивної контрольної сироватки не нижче 1,5;
- $\text{ОГ(CN)} \times 0,5 < \text{ОГ(CN)} < \text{ОГ(CN)} \times 2$.

11.2. Розрахуйте середнє значення ОГ негативної контрольної сироватки:

$$\text{ОГ(CN)CPЗН} = (\text{ОГ1(CN)} + \text{ОГ2(CN)} + \text{ОГ3(CN)})/3$$

11.3. Розрахуйте рівень граничного значення Cut off, для цього до середнього значення ОГ негативної контрольної сироватки додайте коефіцієнт 0,3.

$$\text{Cut off} = \text{ОГ(CN)CPЗН} + 0,3$$

11.4. Розрахуйте Індекс Позитивності (ІП) для кожного досліджуваного зразка, для цього ОГ зразка поділіть на значення Cut off:

$$\text{ІП} = \text{ОГ зразка}/\text{Cut off}$$

12. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- Зразки з ІП > 1,1 вважати **позитивними**;
 Зразки з ІП від 0,9 до 1,1 вважати **невизначеними**;
 Зразки з ІП < 0,9 вважати **негативними**.

При отриманні невизначених результатів рекомендується проведення повторного дослідження зразку в кількох повторах та, у разі відтворення невизначених результатів, новий відбір та аналіз зразка через 5-7 днів. Якщо результати повторного аналізу знову виявляться невизначеними, зразок вважати негативним.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

13.1. Аналітичні характеристики

13.1.1. Прецизійність вимірювання

Повторюваність визначалася шляхом оцінки коефіцієнтів варіації для двох сироваток з різним рівнем IgG антитіл до антигену *Borrelia burgdorferi sensu lato*, тестування яких проводилося в межах однієї постановки аналізу у 43 повторах для кожної з сироваток:

№ сироватки	СРЗН ОГ	СРЗН ІП	CV ОГ, %
1	0,31	1,02	8,29
2	1,08	3,59	6,65

Відтворюваність визначалася шляхом оцінки коефіцієнтів варіації для індексів позитивності 2 сироваток з різним рівнем IgG антитіл до антигену *Borrelia burgdorferi sensu lato*, тестування яких проводилося протягом чотирьох днів в чотирьох постановках аналізу по 8 повторів для кожної сироватки:

№ сироватки	СРЗН ОГ	СРЗН ІП	CV ОГ, %
1	0,27	0,9	8,1
2	1,1	3,66	6,8

13.1.2. Аналітична специфічність

На результати аналізу не впливають наявність в досліджуваних зразках гемоглобіну в концентрації до 10 mg/ml (мг/мл), білірубину до концентрації 0,21 mg/ml (мг/мл) та тригліцеридів до 10 mg/ml (мг/мл).

13.2. Діагностичні характеристики

Клінічні чутливість та специфічність аналізу оцінювались на вибірці 8 позитивних та 8 негативних клінічних зразках сироваток крові та становили 100%. Відносні чутливість та специфічність аналізу досліджували на вибірці з 96 сироваток, охарактеризованих щодо вмісту антитіл класу IgG до антигену *Borrelia burgdorferi sensu lato* у комерційних наборах з CE маркуванням, та за результатами досліджень становили 99,7% та 97,5% відповідно.

14. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Позитивний результат є свідченням наявності IgG антитіл до *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Постановка діагнозу не може ґрунтуватися лише на результатах дослідження рівня IgG-антитіл до *Borrelia burgdorferi* і потребує підтвердження, зокрема оцінки клінічної картини та анамнеза пацієнта, виявлення антитіл класу IgM до *Borrelia burgdorferi*, а також проведення дослідження методом імуноблот.

Негативний результат свідчить про відсутність антитіл класу IgG до *Borrelia burgdorferi*, або рівні антитіл нижче за межу чутливості набору.

З обережністю слід інтерпретувати результати досліджень сироваток пацієнтів з імуносупресією та імунологічними розладами.

15. ЛІТЕРАТУРА

1. Lyme Borreliosis (Lyme disease). In: International travel and health. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. M Cinco 1, R Murgia, M Ruscio, B Andriolo. IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol . 1996 Jun;14(2-3):159-66. doi: 10.1111/j.1574-695X.1996.tb00283.x.
3. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
4. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
5. НПАОП 85.14-1.09-81. Правила облаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарноепідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров`я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

БЛАНК ВНЕСЕННЯ ЗРАЗКІВ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ПАРТІЯ _____

ДАТА _____

БЛАНК ВНОСЕННЯ ЗРАЗКІВ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ПАРТІЯ _____

ДАТА _____

	Виробник
	Медичний виріб для діагностики in vitro
	Номер за каталогом
 YYYY-MM	Використати до
	Код партії
	Температурне обмеження
	Містить достатньо для (n-) випробувань
	Засторога, ознайомитися із супровідними документами
	Ознайомлення з інструкцією із застосування
	Уповноважений представник в Європейському Союзі
	Знак відповідності СЕ
	Знак відповідності технічним регламентам

**З питань роботи набору та технічної підтримки будь-ласка
звертайтеся на номер гарячої лінії:**

0-800-50-29-62

**Усі дзвінки за номером гарячої лінії безкоштовні з будь-якого
мобільного або стаціонарного телефону по всій території України
або пишіть на адресу: info@xema.com.ua**



ТОВ «ХЕМА»
03179, м. Київ, а/с 49
вул. Академіка Єфремова, 23
тел. : +38 044 422-62-16
e-mail: info@xema.com.ua



Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the qualitative detection of IgM antibodies
to *Borelia burgdorferi sensu lato*
in human serum or plasma

Borelia burgdorferi IgM EIA

Catalogue number **REF** **K118G**



For 96 determinations



In vitro diagnostic medical device

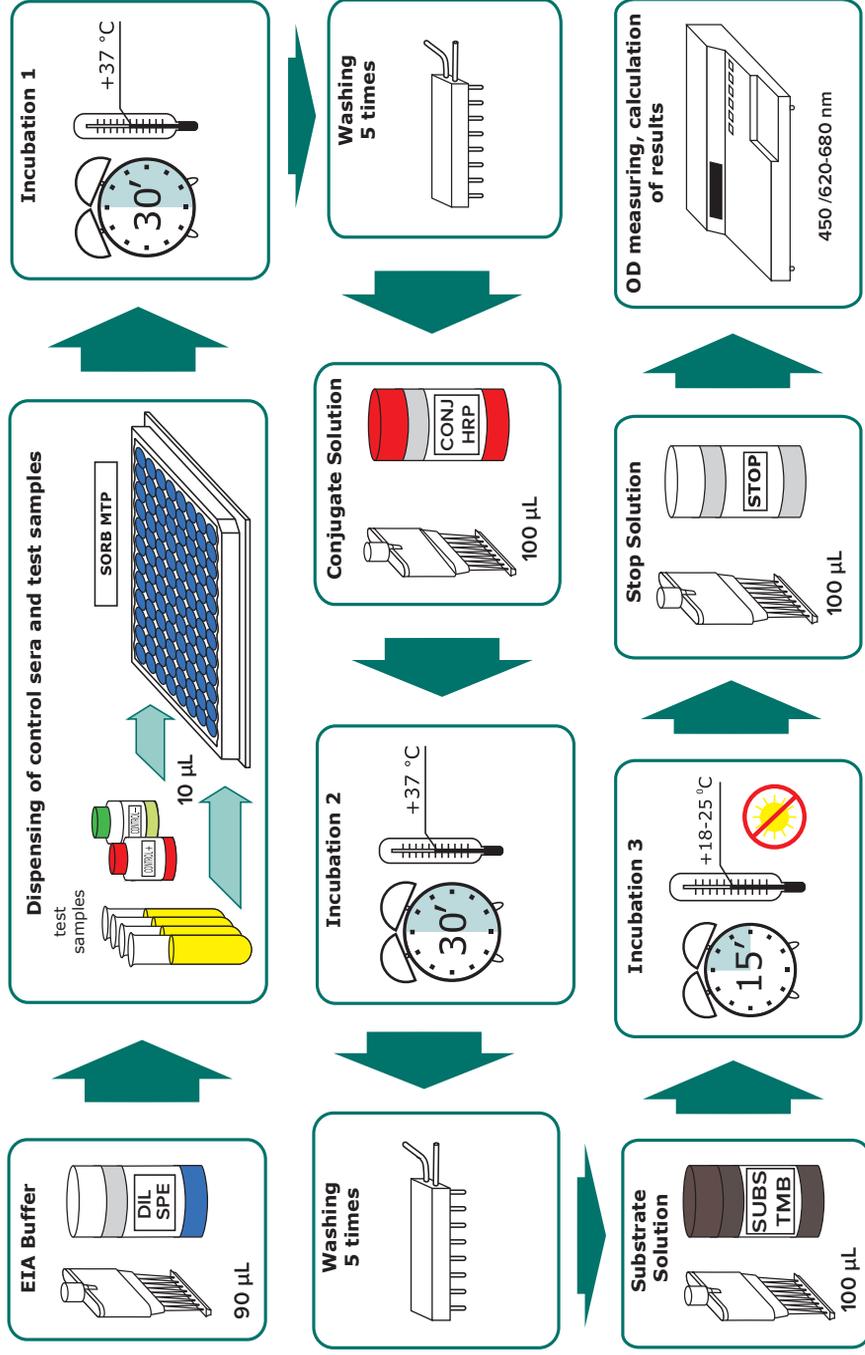


XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.:+38 044 422-62-16
tel.:+38 044 294-69-78
E-mail: info@xema.com.ua
www.xema.com.ua



Authorized Representative in EU:
Polmed.de Beata Rozwadowska
Fichtenstr. 12A, 90763 Fuerth, Germany
tel.:+ 49 911 931 639 67
E-mail: info@polmed.de
www.polmed.de

ASSAY PROCEDURE



During performing several independent series of tests, Positive and Negative Control Serum should be used **each time**.

K118M

CONTENT

1. INTENDED USE	2
2. GENERAL INFORMATION	2
3. TEST PRINCIPLE	3
4. KIT COMPONENTS	4
5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
6. WARNING AND PRECAUTIONS	5
7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES	6
8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL	6
9. REAGENTS PREPARATION	7
10. ASSAY PROCEDURE	7
11. TEST VALIDITY AND CALCULATION OF RESULTS	8
12. INTERPRETATION OF THE RESULTS	8
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
14. LIMITATIONS	9
15. REFERENCES	10
SAMPLES IDENTIFICATION PLAN	11

Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the qualitative detection of IgM antibodies
to *Borelia burgdorferi sensu lato*
in human serum or plasma

Borelia burgdorferi IgM EIA

1. INTENDED USE

ELISA reagent kit Borelia burgdorferi IgM EIA is a solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgM antibodies to *Borelia burgdorferi sensu lato* in human serum or plasma.

The field of application is clinical laboratory diagnostics.

2. GENERAL INFORMATION

Borrelia burgdorferi sensu lato - is a group of borreliosis or Lyme disease pathogens, a common infection, the main host and vector of which is the ixodid tick. The disease is transmitted only through a tick bite.

In the early stages of borreliosis, fatigue, chills and headaches may be observed, and later more serious symptoms may occur, such as joint pain, meningitis, numbness in the extremities, facial nerve paralysis, memory disorders, and eye and heart damage. After the spirochete penetrates the skin, a creeping erythema occurs, and after several days or weeks, it reaches many organs by haematogenous or lymphatic means. In general, the incubation period is from 3 to 45 days.

Early diagnosis of the disease is based on clinical and epidemiological data. The diagnosis is confirmed by laboratory, usually by serological methods - the detection of specific antibodies to *Borrelia burgdorferi* in the blood.

IgM antibodies appear in the blood first, a few days after infection, but can be detected by laboratory tests in 2-3 weeks. After about 6 weeks, the concentration of antibodies reaches a maximum and then gradually decreases. IgG antibodies begin to be detected 4-6 weeks after infection and the maximum amount of IgG antibodies is synthesised 2-3 months after the onset of early symptoms of the disease. Then their number gradually decreases, but they remain in the body for several years.

3. TEST PRINCIPLE

The detection of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* is based on the indirect enzyme immunoassay principle. On the inner surface of the microplate wells are immobilized recombinant *Borrelia burgdorferi* antigen. The analysis procedure includes three stages of incubation:

- during the first stage specific to *Borrelia burgdorferi* antibodies from the specimen are bound onto the microwell surface;
- during the second stage horseradish peroxidase-conjugated specific monoclonal anti-IgM antibodies bind to the antigen-antibody complexes, fixed in the formed at the previous stage complexes;
- during the third stage, the complexes formed due to the reaction with the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine are visualized.

After stopping the reaction with a stop solution, the intensity of the color of the microwells is measured. The optical density (OD) in the microwell is directly related to the concentration of the measured IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* in test specimen.

4. KIT COMPONENTS

Code of component	Symbol	Name	Volume	Qty, pcs.	Description
P118MZ	SORB MTP	Microplate	-	1	96-well polystyrene strip microplate coated with recombinant antigen of <i>Borrelia burgdorferi</i> , ready to use
CN118MZ	CONTROL -	Negative Control Serum K-	0.5 mL	1	Solution based on human serum, free of IgM antibodies to <i>Borrelia burgdorferi</i> , with preservative, ready to use (yellow liquid)
CP118MZ	CONTROL +	Positive Control Serum K+	0.2 mL	1	Solution based on human serum, containing of IgM antibodies to <i>Borrelia burgdorferi</i> , with preservative, ready to use (red liquid)
T118MZ	CONJ HRP	Conjugate Solution	12 mL	1	Solution of monoclonal antibodies to IgM conjugated to the horseradish peroxidase, ready to use (red liquid)
SP118MZ	DIL SPE	EIA Buffer	12 mL	1	Buffer solution with detergent and preservative, ready to use (purple liquid)
R055Z	SUBS TMB	Substrate Solution	12 mL	1	Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution, ready to use (colourless liquid)
S008Z	BUF WASH 26X	26x Concentrate Washing Solution	30 mL	1	Buffer solution with detergent, 26x concentrate (colourless liquid)
R050Z	STOP	Stop Solution	12 mL	1	5.0% solution of sulphuric acid, ready to use (colourless liquid)

The kit also includes instruction for use, quality control data sheet and plate sealing tape (2 pcs).

5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- microplate photometer with 450/620-680 nm wavelength;
- dry thermostat for $+37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- automatic plate washer (optional);
- micropipettes with variable volume, range volume 5-1000 μL ;
- graduated cylinder of 1000 mL capacity;
- distilled or deionized water;
- timer;
- vortex mixer;
- disposable gloves;
- absorbent paper.

6. WARNING AND PRECAUTIONS

In order to prevent incorrect results, strictly follow the recommended order and duration of the analysis procedure.

6.1. The kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional laboratory use.

6.2. Follow the rules mentioned below during the kit using:

- do not use kit beyond expire date;
- do not use the kit if its packaging is damaged;
- in order to avoid contamination, use new tips to pipette samples and reagents;
- use only verified equipment;
- close each vial with its own cap, after using the reagent;
- do not use components of other kits or reagents of other manufacturers;
- do not let wells dry after completing the rinsing step; immediately proceed to the next stage;
- avoid bubbles when adding reagents.

ATTENTION! The TMB substrate solution is light sensitive. Avoid prolonged exposure of the component to light.

6.3. Some kit components, such as stop solution, substrate solution, and washing solution, may cause toxic or irritant effects. If they get on the skin or mucosa, the affected area should be washed with plenty of running water.

6.4. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

6.5. The positive and negative control serum included in the kit are negative for antibodies to HIV 1,2, hepatitis C virus and HBsAg, but the reagents should be considered as potentially infectious material and handled carefully.

6.6. Specimens must not contain any azide compounds, as they inhibit activity of peroxidase.

6.7. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection.

6.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

6.9. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA LLC.

6.10. Serious incidents related to the kit must be reported to the manufacturer, Authorized Representative, and to the Competent Authority of the EU member state(s) where the incident has occurred.

7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES

7.1. Blood sampling should be carried out from the cubital vein with a disposable needle using a vacuum blood sampling system. Serum or plasma specimens should be clearly labeled and identified. Serum must be separated from the clot as early as possible to avoid hemolysis of red blood cells. If there are any visible particles in the sample, they should be removed by centrifugation at 3000-5000 rpm for 20 minutes at room temperature or by filtration.

Don't use samples with high lipidemia, hemolysis as they may give false test results.

7.2. Specimen should be stored at +2...+8°C up to 3 days. Specimen held for a longer time, should be placed in a freezer at -15°C or below, avoid no more than three cycles of thawing-freezing samples.

7.3. For the transportation of samples, it is recommended to use triple packaging. The primary package is the labeled tube containing the sample. Secondary packaging is a polyethylene bag that is hermetically closed with a zip-lock. The outer packaging is a heat-insulating container, while the secondary packaging is placed in the outer packaging for transportation in the center of the thermal container. Frozen refrigerants are placed on the bottom, along the side walls of the thermal container, and cover the samples with them.

8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL

Information about the singularity storage conditions, transportation of the kit, and disposal of waste should be taken into account by all persons who participate in these processes.

8.1. Transportation

The *Borrelia burgdorferi* IgM EIA kit should be transported in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Single transportation at the temperature up to 25°C for 5 days is acceptable.

8.2. Storage

The *Borrelia burgdorferi* IgM EIA kit should be stored in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Do not freeze.

The kit contains reagents sufficient for 96 determinations including Positive and Negative Control Serum.

Once opened test-kit is stable for 2 months when stored properly as intended by manufacturer at 2-8°C.

In case of partial use of the kit, the components should be stored in the following way:

- the remaining strips should be immediately resealed in the bag along with the silica gel, closed with the zip-lock, and stored at +2...+8°C within 2 months;
- EIA Buffer, Substrate Solution, Stop Solution, and Washing Solution concentrate after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C until the kit's shelf life;
- Conjugate Solution, Positive and Negative Control Serum after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C within 2 months;
- diluted Washing Solution can be stored at room temperature (+18...+25°C) for up to 5 days or at +2...+8°C for up to 14 days.

Kits that were stored in violation of the storage condition cannot be used.

8.3. Disposal

Expired kit components, used reagents and materials, as well as residual samples must be inactivated and disposed of in accordance with legal requirements.

9. REAGENTS PREPARATION

9.1. All reagents (including microstrips) and test samples should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before use.

9.2. Microplate preparation

Open the package with the microplate and install the required number of strips into the frame. The remaining strips should be immediately resealed in the bag along with the silica gel and closed with the zip-lock to prevent moisture from affecting the plate's strips.

9.3. Washing solution preparation

Add the contents of the 30 mL washing solution concentrate vial to 750 mL of distilled or deionized water and mix thoroughly. In case of partial use of the kit, take the necessary amount of washing solution concentrate and dilute it 26 times with distilled or deionized water.

The spending of the components in case of partial use of the kit is given in the table:

Quantity of strips	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume of the washing solution concentrate, mL	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	27.5	30
Volume of water, mL	62.5	125	187.5	250	312.5	375	437.5	500	562.5	625	687.5	750

10. ASSAY PROCEDURE

- 10.1. Put the desired number of strips into the frame based on the number of test samples and 4 wells for Positive and Negative Control Serum (1 well for Positive Control (CP) and 3 wells for Negative Control Serum (CN)).
- 10.2. Dispense **90 µL of EIA Buffer** to all wells.
- 10.3. Dispense **10 µL of Positive and Negative Control Serum as well as 10 µL of test serum/plasma samples (SAMP)** to the wells of the microplate according to the scheme below. The introduction of Positive and Negative Control Serum and test samples should be carried out within 5 minutes to ensure equal incubation time for the first and last samples.

NOTE: during performing several independent series of tests, Positive and Negative Control Serum should be used each time.

Scheme of introduction of samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	SAMP5	SAMP13	SAMP21								
B	CN	SAMP6	SAMP14	SAMP22								
C	CN	SAMP7	SAMP15	SAMP23								
D	CN	SAMP8	SAMP16									
E	SAMP1	SAMP9	SAMP17									
F	SAMP2	SAMP10	SAMP18									
G	SAMP3	SAMP11	SAMP19									
H	SAMP4	SAMP12	SAMP20									

- 10.4. Carefully mix the contents of the microplate in a circular motion on a horizontal surface, cover strips with a plate sealing tape and incubate for **30 minutes at +37°C**.
- 10.5. At the end of the incubation period, remove and discard the plate cover. Aspirate and wash each well **5 times** using an automatic washer or an 8-channel dispenser. For each washing, add 300 µL of Washing Solution (see 9.3) to all wells, then remove the liquid by aspiration or decantation. The residual volume of the Washing Solution after each aspiration or decantation should be no more than 5 µL. After washing, carefully remove the remaining liquid from the wells on the absorbent paper. For the automatic washer/analyzer, the Washing Solution volume can be increased to 350 µL.
- 10.6. Add **100 µL of Conjugate Solution** to all wells.
- 10.7. Cover strips with a plate sealing tape and incubate for **30 minutes at +37°C**.
- 10.8. At the end of the incubation period, aspirate and wash each well **5 times** as described in 10.5.
- 10.9. Add **100 µL of Substrate Solution** to all wells. The introduction of the Substrate Solution into the wells must be carried out within 2-3 minutes. Incubate the microplate in the dark **at room temperature (+18...+25°C) for 15 minutes**.
- 10.10. Add **100 µL of Stop Solution** to all wells in the same order as the Substrate Solution. After adding the Stop Solution, the contents of the wells turn yellow.
- 10.11. Read the optical density (OD) of the wells at 450 nm and reference light filters 620–680 nm using a microplate photometer within 5 minutes of adding the stop solution. Set photometer blank on air.

11. TEST VALIDITY AND CALCULATION OF RESULTS

11.1. The test results are valid only if Positive and Negative Control Serum are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications, namely:

- OD of CONTROL- < 0.15;
- OD of CONTROL+ > 1.5;
- $OD(CN) \times 0,5 < OD(CN) < OD(CN) \times 2$.

11.2. Calculate the mean OD value of the Negative Control Serum:

$$\text{meanOD(CN)} = (\text{OD1(CN)} + \text{OD2(CN)} + \text{OD3(CN)})/3$$

11.3. Calculate the Cut Off value by adding to the mean OD value of the Negative Control Serum the coefficient 0.3.

$$\text{Cut off} = \text{meanOD(CN)} + 0.3$$

11.4. Calculate Positivity Index (PI) for each sample by dividing the OD of the sample by Cut off value:

$$\text{PI} = \text{ODsample}/\text{Cut off}$$

12. INTERPRETATION OF THE RESULTS

- If PI value > 1.1 the result is **POSITIVE**,
- If PI value is between 0.9 and 1.1 the result is **EQUIVOCAL**,
- If PI value < 0.9 the result is **NEGATIVE**.

If equivocal results are obtained, it is recommended to conduct a reexamination of the sample in several replicates. If the result is equivocal again, a new sample should be obtained within 5-7 days and retested. If the result remains equivocal, the sample should be considered negative.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1. Analytical performance characteristics

13.1.1. Precision of Measurement

Reproducibility (Intra assay repeatability) was determined by evaluation the coefficient of variation (CV) for 2 different samples, with different levels of IgM antibodies to the *Borrelia burgdorferi sensu lato* antigen, during 1 day in 43 replicates on one series of ELISA kit.

Nº serum	mean OD	mean PI	CV PI, %
1	0.31	1.02	8.29
2	1.08	3.59	6.65

Reproducibility (Inter assay reproducibility) was determined by evaluating the coefficients of variation (CV) for 2 samples of each serum for 4 days in 8-replicate determinations.

Nº serum	mean OD	mean PI	CV PI, %
1	0.27	0.9	8.1
2	1.1	3.66	6.8

13.1.2. Analytical specificity

For the analysis result is not affected by the presence in the sample of bilirubin in a concentration of up to 0.21 mg/mL, hemoglobin in a concentration of up to 10 mg/mL and triglycerides in a concentration of up to 10 mg/mL.

13.2. Diagnostic performance characteristics

The clinical sensitivity and specificity of the assay were evaluated using a serum panel with 8 positive and 8 negative clinical serum samples and were 100%. The relative sensitivity and specificity of the assay were investigated in a sample of 96 donor sera characterised for the content of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* antigen in commercial Kits, and the results were 99.7% and 97.5%, respectively.

14. LIMITATIONS

A positive result is evidence of the presence of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* antigen. The diagnosis cannot be based on the results of an IgM antibody test to *Borrelia burgdorferi* alone and requires confirmation, including an assessment of the patient's clinical presentation and history, the detection of IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi* and conducting an immunoblot test.

A negative result indicates the absence of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* or antibody levels below the limit of sensitivity of the kit.

The results of serum tests in patients with immunosuppression and immunological disorders should be interpreted with caution.

15. REFERENCES

1. Lyme Borreliosis (Lyme disease). In: International travel and health. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. M Cinco 1, R Murgia, M Ruscio, B Andriolo. IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* . 1996 Jun;14(2-3):159-66. doi: 10.1111/j.1574-695X.1996.tb00283.x.
3. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
4. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
5. НПАОП 85.14-1.09-81. Правила облаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарноепідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров`я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____

DATE _____

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____

DATE _____

	Manufacturer
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
 YYYY-MM	Use-by date
	Batch code
	Temperature limit
	Contains sufficient for <n> tests
	Caution
	Consult instructions for use
	Conformity Marking with technical regulations in Ukraine
	Authorized representative in the European Community/European Union
	CE Conformity Marking

**For any issues related to operation of the kit and technical support,
please contact by telefon number**

+38 044 294-69-78

or write to:

qa@xema.com.ua



XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.:+38 044 422-62-16
tel.:+38 044 294-69-78
E-mail: qa@xema.com.ua
www.xema.com.ua