

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

«28»

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов
класса М к антигенам лямблий в сыворотке (плазме) крови
(Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к антигенам лямблий в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Лямблиоз – часто встречающееся паразитарное заболевание тонкого кишечника человека, вызываемое *Ciardia lamblia* – представителем семейства *Protozoe*. Лямблии существуют в двух отдельных формах – цистах (статическая форма) и трофозонтах (пролиферативная форма).

1.3. Заражение человека происходит оральным путем, при попадании цист лямблий в желудочно-кишечный тракт. Источник инвазии – некипяченая питьевая вода, вода водоемов, немые фрукты и овощи, грязные руки и контакт с домашними животными.

Традиционно диагностика лямблиоза проводится микроскопическим методом по обнаружению цист или трофозонтов в образцах фекалий или дуоденальном содержимом.

Дополнительным методом диагностики лямблиоза является иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на обнаружении в крови инвазированного антител, специфичных к антигенам лямблий.

Ранние антитела (IgM) появляются на 10-14 день после начала инвазии. Затем появ-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и начальником лаборатории диагностики паразитарных инфекций Т.Н. Ткаченко

ляются специфические IgG, концентрация которых через 1-2 месяца после полной элиминации паразита в крови человека резко снижается:

- 1) острый лямблиоз – выявляются специфические IgM;
- 2) начало стадии реконвалесценции острого лямблиоза либо обострение хронического лямблиоза – обнаружены как IgG, так IgM и IgA;
- 3) хронический лямблиоз – обнаружены преимущественно IgG, которые, как известно, могут сохраняться до 6-9 месяцев после излечения с постепенным снижением титров.

Определение иммуноглобулинов различных классов к антигенам лямблий целесообразно дополнительно включать в комплексное обследование детей с аллергическими симптомами, дерматитами, с гастродуоденитами, а также часто болеющих детей. Это способствует более надежному выявлению лямблиозной инвазии, позволяет своевременно провести специфическое лечение и в последующем осуществить контроль его эффективности.

1.4. Набор рассчитан на проведение 48 анализов образцов сыворотки (плазмы) крови в дубликатах, включая контроли, или 12 независимых постановок ИФА по 8 определений, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgM к антигенам лямблий представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. Специфическими компонентами набора реагентов являются антигены лямблий, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат моноклональных антител IgM человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами лямблий происходит связывание IgM и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата моноклональных антител к IgM человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волна в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к антигенам лямблий в анализируемом образце сыворотки.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами лямблий, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgM к антигенам лямблий, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgM к антигенам лямблий, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgM человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Перекрестные реакции при описторхозе, токсокарозе, эхинококкозе, трихинеллезе, аскаридозе не выявлены.

3.2. Специфическая активность:

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий – соответствие результатов выявления набором IgM к антигенам лямблий требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-134/1), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками №1-№8 больше либо равны величине

диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№1-№8} \geq ОП_d$).

Специфичность выявления иммуноглобулинов классов М к антигенам лямблий – соответствие результатов выявления набором IgM к антигенам лямблий требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-134/1), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками №9-№16 меньше либо равны величине диагностического значения оптической плотности, умноженного на 0,85 ($ОП_{№9-№16} \leq 0,85 \times ОП_d$).

3.3. Титр стандартного образца предприятия СОП⁺ (рег. № 05-2-18), аттестованного ОБТК АО «Вектор-Бест», должен быть не менее 1:800.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших 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, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °C;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °C в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего буферного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного (K^+) и отрицательного (K^-) контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При этом темно-красный цвет должен измениться на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, ИФА данного образца может дать неправильный результат.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата конъюгата и рабочего буферного раствора не более, чем за 5-10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий буферный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Конъюгат, концентрат, (мл)	Рабочий буферный раствор (мл)	Тетраметилбензидин, концентрат (мл)	Субстратный буферный раствор (мл)
1	2,0	До 50	0,1	1,0	0,05	1,0
2	4,0	До 100	0,2	2,0	0,10	2,0
3	6,0	До 150	0,3	3,0	0,15	3,0
4	8,0	До 200	0,4	4,0	0,20	4,0
5	10,0	До 250	0,5	5,0	0,25	5,0
6	12,0	До 300	0,6	6,0	0,30	6,0
7	14,0	До 350	0,7	7,0	0,35	7,0
8	16,0	До 400	0,8	8,0	0,40	8,0
9	18,0	До 450	0,9	9,0	0,45	9,0
10	20,0	До 500	1,0	10,0	0,50	10,0
11	22,0	До 550	1,1	11,0	0,55	11,0
12	24,0	До 600	1,2	12,0	0,60	12,0

7.7. Приготовление рабочего раствора ТМБ.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата ТМБ и СБР не более, чем за 5-10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор ТМБ можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов

В лунки планшета внести по 100 мкл K^+ , K^- и РРС по следующей схеме:

при использовании 1 стрипа – 1 лунка K^+ , 2 лунки K^- и 1 лунка РРС.

2 стрипов и более – 2 лунки K^+ , 2 лунки K^- и 2 лунки РРС.

7.10. Внесение исследуемых образцов сыворотки (плазмы).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл пред-

варительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.5) в дубликатах, тщательно перемешать.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5-7 мин.

7.10.1. Определение титра исследуемых образцов

При определении титра IgM тестирование исследуемых образцов произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В соответствующие лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов в дубликатах (п. 7.5), тщательно перемешать. В соответствующие лунки рядов В-Н внести по 100 мкл РРС. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в дезинфицирующий раствор по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя во все лунки по 400 мкл рабочего буферного раствора (см п. 7.3) в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки за исключением лунок с РРС по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6). В лунки с РРС внести по 100 мкл РРС.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор конъюгата из флакона или пластиковой ванночки удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.14. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.15. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см п. 7.7).

Для внесения рабочего раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C .

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор ТМБ удалить из стеклянного флакона или пластиковой ванночки в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}K^-$), положительным контрольным образцом ($ОП_{ср}K^+$), раствором для разведения сывороток (PPC).

9.2. Среднее значение ОП в лунках с PPC не должно превышать 0,15 ед. опт. пл.

Среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,30 ед. опт. пл.

Среднее значение ОП в лунках с K^+ должно быть не менее, чем 0,50 ед. опт. пл.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_d$).

$$ОП_d = ОП_{ср. K^-} + 0,2$$

9.5. Результат анализа считается положительным, если $ОП_{обр.} \geq ОП_d$.

Результат анализа считается отрицательным, если $ОП_{обр.} \leq 0,85 \times ОП_d$.

где: $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

Результат анализа считается сомнительным, если $0,85 \times ОП_d < ОП_{обр.} < ОП_d$. Рекомендуется повторно провести иммуноферментный анализ данного образца.

9.6. За титр положительной сыворотки (плазмы) принимают ее наибольшее разведение, при котором оптическая плотность образца $ОП_{обр.} \geq ОП_d$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (9 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора.

- неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить в закрытом на замок пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, концентрат конъюгата, концентрат тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°С не более 3 ч;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при температуре от 18 до 25°С не более 3 ч;

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-БЕСТ» по адресу:

630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-35-56, 227-67-64.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Начальник лаборатории диагностики
паразитарных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



Т.Н. Ткаченко

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 70 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



А.В. Масляков

2020 г.