

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г

№ \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ООО «ИмДи-спектр»

И.А. Кривенчук

« 22 »

20 \_\_\_\_



## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G к *Lamblia intestinalis* «Лямблиоз-IgG-антитела»

#### 1. Назначение

1.1 Выявление антител класса G к *Lamblia intestinalis* в сыворотке (плазме) крови человека, может быть использован при проведении сероэпидемиологических исследований.

1.2 Набор рассчитан на проведение анализа 90 неизвестных, 1 контрольного положительного образца в двух повторях, 1 контрольного отрицательного образца в трех повторях, 1 контроля конъюгата (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

#### 2. Характеристика набора

##### 2.1. Принцип действия

Принцип действия набора реагентов основан на непрямом иммуноферментном анализе. На первой стадии анализа исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным антигеном *Lamblia intestinalis*. Если в сыворотке (плазме) содержатся антитела к *Lamblia intestinalis*, образуется комплекс антиген-антитело. После промывки планшета в лунки планшета вносят антивидовой конъюгат (антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена), который связывается с антителами класса G к *Lamblia intestinalis*, если они присутствуют в образце. Визуализация образовавшегося комплекса «антиген-антитело-конъюгат» происходит за счет ферментативной реакции пероксидазы с субстратной смесью и образования окрашенного продукта. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты (стоп-реагент) результаты анализа учитывают фотометрически. Величина оптической плотности (ОП) окрашенной хромогенной смеси пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы.

##### 2.2 Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Lamblia intestinalis* (иммуносорбент) - 1 шт.;
- контрольный положительный образец на основе сыворотки крови человека, содержащий IgG к *Lamblia intestinalis* (K+) - прозрачная красного цвета жидкость - 1 флакон (1,3 мл);
- контрольный отрицательный образец на основе сыворотки крови человека, не содержащий IgG к *Lamblia intestinalis* (K-) - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость - 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат (Kг) - моноклональные мышинные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, прозрачная зеленого цвета жидкость - 1 флакон (0,4 мл);

- буферный раствор для разведения сывороток (РБР-С) - прозрачная синего цвета жидкость - 1 флакон (11 мл);
- буферный раствор для разведения конъюгата (РБР-К) - прозрачная зеленого цвета жидкость - 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т(концентрат x25)) – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость. Допускается выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании при температуре 37 °С в течение 30 мин - 1 флакон (26,0 мл);
- буферный раствор для субстрата (БРС) - прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), хромоген - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость – 1 флакон (0,7 мл);
- стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон (6,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета - 2 шт.;
- ванночка для реагентов - 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4-200 мкл - 16 шт..

### 3. Аналитические и диагностические характеристики

Набор реагентов «Лямблиоз-IgG-антитела» предназначен для выявления антител класса G к *Lamblia intestinalis* в сыворотке (плазме) крови человека.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G *Lamblia intestinalis* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G *Lamblia intestinalis* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

### 4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты 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.

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.

### 5. Оборудование и материалы

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм;
- прибор, позволяющий производить инкубирование при температуре 37±1 °С (термостат);
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;

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

- вода дистиллированная.

## **6. Анализируемые образцы**

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 40 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2 - 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более 3 мес.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность контаминации посторонней микрофлорой.

При необходимости осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией, не использовать термоинактивированные сыворотки и сыворотки с добавлением азида натрия. Избегать повторных циклов замораживания и оттаивания образцов. Для возможного повторного исследования образца сыворотки желательно образец разделить на аликвоты, которые хранить при температуре 2 - 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более 3 мес.

Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки.

## **7. Проведение анализа**

**Внимание!** При проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.

Окисляющие агенты, ионы металлов, моющие средства на посуде могут разлагать ТМБ. Во избежание ложных результатов необходимо тщательно отмывать посуду раствором кислоты серной или соляной 1 моль/л с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Перед постановкой реакции все компоненты тест-системы необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

### **7.1 Приготовление реагентов, растворов, исследуемых образцов сывороток**

#### **7.1.1 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т**

При наличии во флаконе с ФСБ-Т(концентрат x25) визуально определяемого осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое флакона с ФСБ-Т(концентрат x25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в мерный цилиндр внести концентрат ФСБ-Т из флакона и добавить дистиллированную воду в соответствии с таблицей.

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т (концентрат x25) хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора, рабочий раствор ФСБ-Т - при температуре от 2 до 8 °С в течение двух недель.

#### Расход реагентов набора «Лямблиоз-IgG-антитела»

|                                                     | Количество используемых стрипов |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                                     | 1                               | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12     |
| Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т               |                                 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| ФСБ-Т (концентрат x25), мл                          | 2                               | 4      | 6      | 8      | 10     | 12     | 14     | 16     | 18     | 20     | 22     | 26     |
| Вода дистиллированная, мл                           | до 50                           | до 100 | до 150 | до 200 | до 250 | до 300 | до 350 | до 400 | до 450 | до 500 | до 550 | до 650 |
| Приготовление рабочего раствора конъюгата           |                                 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| РБР-К, мл                                           | 1                               | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 13     |
| Конъюгат, мл                                        | x*                              | 2x     | 3x     | 4x     | 5x     | 6x     | 7x     | 8x     | 9x     | 10x    | 11x    | 13x    |
| Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина |                                 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| БРС, мл                                             | 1                               | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 13     |
| ТМБ, мл                                             | 0,050                           | 0,100  | 0,150  | 0,200  | 0,250  | 0,300  | 0,350  | 0,400  | 0,450  | 0,500  | 0,550  | 0,650  |

\* x - объем конъюгата - подбирается для каждой серии на производстве тест-систем при изготовлении наборов

#### 7.1.2 Приготовление РБР-С, РБР-К и БРС

РБР-С, РБР-К и БРС – готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона раствор хранить в закрытом виде при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

#### 7.1.3 Приготовление контрольных образцов

K<sup>+</sup> и K<sup>-</sup> готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона контрольные образцы хранить при температуре от 20 до 25 °С до 48 ч, при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

#### 7.1.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата подбирается для каждой серии тест-системы.

При постановке ИФА на полном планшете из флакона с Кг отобрать объем конъюгата, указанный в таблице для полного планшета (12 стрипов) и перенести его во флакон с РБР-К. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

При постановке ИФА на одном или нескольких стрипах разборного планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем РБР-К и добавить соответствующий объем конъюгата, исходя из приведенной выше таблицы. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Рабочий раствор конъюгата готовится непосредственно перед использованием и хранению не подлежит. При использовании нескольких стрипов планшета остаток конъюгата хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

#### 7.1.5 Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

При постановке ИФА на полном планшете из флакона с ТМБ отобрать 650 мкл раствора и перенести его во флакон с БРС, тщательно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем БРС и добавить соответствующий объем ТМБ (см. таблицу).

Хранение: рабочий раствор тетраметилбензидина хранить при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте до 20 мин, остаток ТМБ хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

**Внимание!** Отбирать концентрат ТМБ только новыми наконечниками для пипеток.

#### 7.1.6 Приготовление стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

#### 7.1.7 Использование планшета с иммобилизованным антигеном

Перед вскрытием пакет с планшетом необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 20 до 25 °С. При использовании нескольких стрипов оставшиеся стрипы планшета хранить в герметично закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

### 7.2. Проведение иммуноферментного анализа

#### ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.1. Планшет с иммобилизованным антигеном промыть один раз рабочим раствором ФСБ-Т с помощью автоматического промывателя или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 300 мкл раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.2. В лунки А1 и В1 планшета внести по 100 мкл К<sup>+</sup> контрольного положительного образца, в лунки С1, Д1 и Е1 внести по 100 мкл К<sup>-</sup> контрольного отрицательного образца, в лунку F1 внести 90 мкл РБР-С для контроля конъюгата. В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток, тщательно перемешать пипетированием, при этом цвет раствора в лунке должен измениться. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 10 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

После этого планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

**Внимание!** Пленка предназначена для одноразового использования!

7.2.3. По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т пять раз и удалить остатки влаги из планшета (см. п.7.2.1).

#### ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.4. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. приготовление п.7.1.4). Планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.5 По окончании второй инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т 5 раз и удалить остатки влаги из планшета (см. п.7.2.1).

#### ТРЕТЬЯ (ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. приготовление п.7.1.5). Планшет поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре (37±1) °С.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора

*Во избежание ложных результатов при раскпывании рабочего раствора тетраметилбензидина:*

*а) не касайтесь стенок лунок планшета наконечниками;*

б) избегайте образования аэрозолей и попадания субстратной смеси на внутренний фильтр пипетки.

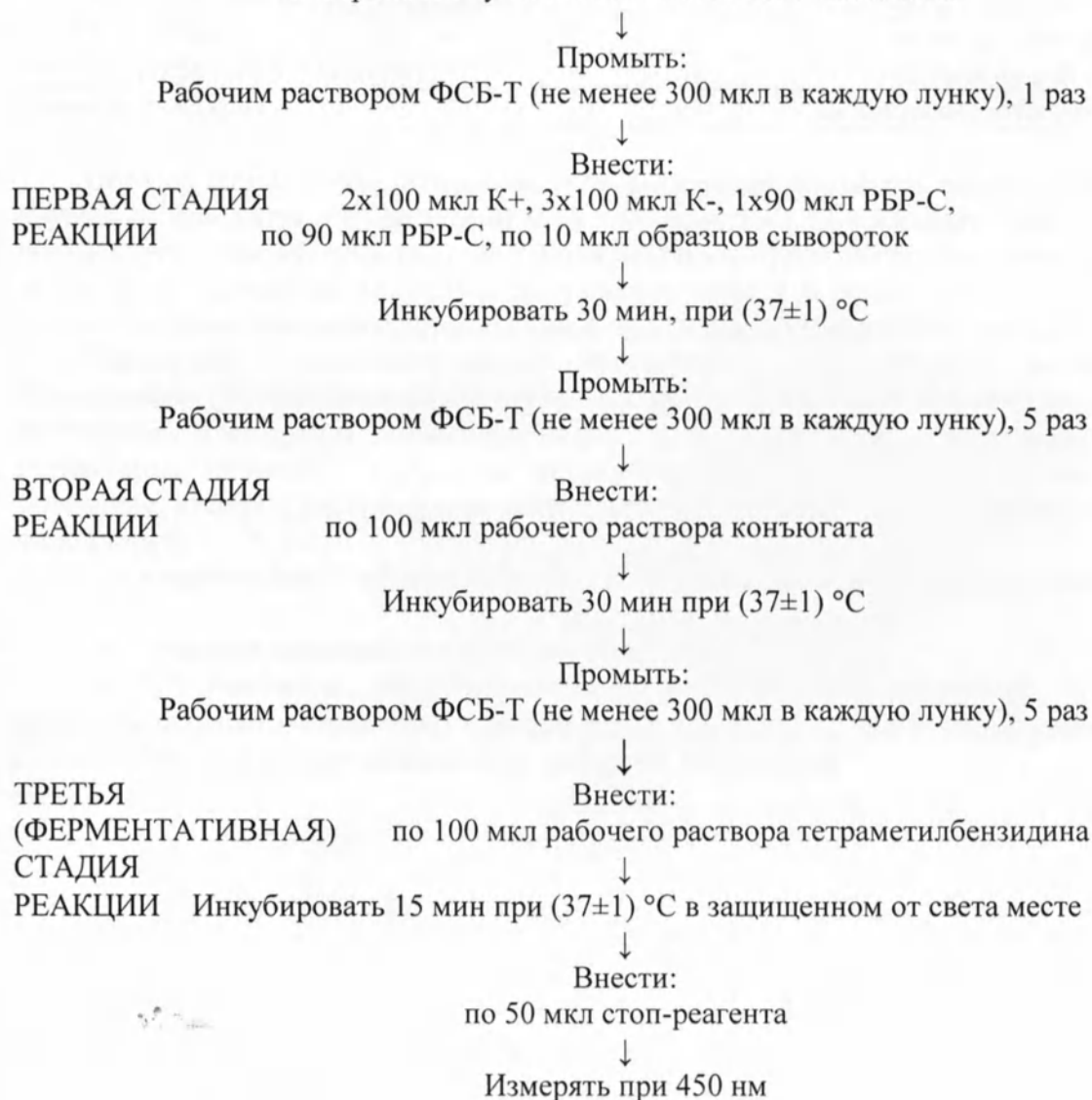
7.2.7 Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

**Внимание!** Следует избегать попадания стоп-реагента на открытые участки тела и одежду. При попадании - промыть большим количеством воды!

#### Схема проведения анализа

**Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!**

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Lambliа intestinalis*



#### 8. Регистрация результатов анализа

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Измерение проводят сразу или в течение 15 мин после остановки реакции.

#### 9. Учет и оценка результатов

Результаты учитывают только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с контролем конъюгата ОПККг не превышает 0,15,

- среднее значение в лунках с  $K^-$  ОПК<sup>-</sup>(ср.) не более 0,2,
  - среднее значение в лунках с  $K^+$  ОПК<sup>+</sup>(ср.) не менее 1,0.
- В противном случае исследование необходимо повторить.

На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности (ОПкрит).

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПК}^-(\text{ср.}) + 0,25$$

Исследуемые образцы сывороток оценивают по величине оптической плотности (ОП образца) в соответствии с таблицей.

| Оптическая плотность сыворотки                                | Результат           |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|
| от 0 до $0,85 \times \text{ОПкрит}$                           | отрицательный       |
| от $0,85 \times \text{ОПкрит}$ до $1,15 \times \text{ОПкрит}$ | сомнительный        |
| от $1,15 \times \text{ОПкрит}$ до $2 \times \text{ОПкрит}$    | слабоположительный  |
| от $2 \times \text{ОПкрит}$ до $4 \times \text{ОПкрит}$       | положительный       |
| более $4 \times \text{ОПкрит}$                                | сильноположительный |

Образец считают сомнительным, если оптическая плотность исследуемого образца сыворотки находится в интервале от  $0,85 \times \text{ОПкрит}$  до  $1,15 \times \text{ОПкрит}$ . Такую сыворотку рекомендуется исследовать повторно. Если результат будет опять сомнительным, следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2-4 недели. В случае повторного получения сомнительного результата такой образец считать отрицательным.

Пациентам с положительными результатами рекомендуется дополнительное обследование. Для подтверждения диагноза необходимо исследовать образцы сывороток, полученных в острую и реconvalesцентную стадии болезни. Диагностически значимым результатом является 4-х кратное увеличение уровня антител в парных образцах сыворотки, взятых с интервалом не менее 14-21 сут от одного пациента и определенных в одном опыте.

Все клинические и лабораторные данные должны быть рассмотрены в совокупности.

#### 10. Условия хранения и эксплуатации набора

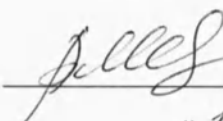
Набор реагентов «Лямблиоз-IgG-антитела» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора реагентов 12 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование производить при температуре 2 - 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С в течение 5 сут. На дальние расстояния только авиатранспортом.

**По вопросам, касающимся качества набора «Лямблиоз-IgG-антитела»,**  
следует обращаться в ООО «ИмДи-спектр» по адресу:  
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, п. Кольцово, д.2а;  
тел/факс (383) 336-76-23

Начальник производства  
ООО «ИмДи-спектр»

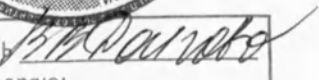
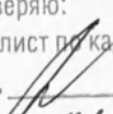
 В.Г. Майданюк  
«15» августа 2011 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГБОУ ДПО РМАПО  
Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов  
«20» 01 2012 г.

|                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Подпись  |
| удостоверяю:                                                                                |
| Специалист по кадрам РМАПО                                                                  |
| Подпись  |
| «31» 01 2012 года                                                                           |

Пронумеровано,  
прошнуровано и опечатано  
8 листов

Директор  
ООО «ИмДи-спектр»

«16» *мск* 20 *г.*

