

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G, M, A К *Lamblia intestinalis*

## " Лямблиоз -AGM"

Настоящая инструкция распространяется на "Лямблиоз- AGM" - тест-систему иммуноферментную, предназначенную для выявления антител класса G, M, A к *Lamblia intestinalis* методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

Набор состоит из 11 реагентов: –

1. Иммуносорбент – антиген *Lamblia intestinalis*, сорбированный в лунках планшета;
2. Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т), 25х концентрат, – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость;
3. Разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С) – прозрачная опалесцирующая жидкость фиолетового цвета;
4. Раствор конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (PKr- IgG) – прозрачная опалесцирующая жидкость **зелёного** цвета;
5. Раствор конъюгата моноклональных антител мыши к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (PKr- IgM) – прозрачная опалесцирующая жидкость **синего цвета**;
6. Раствор конъюгата моноклональных антител мыши к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (PKr- IgA) – прозрачная опалесцирующая жидкость **жёлтого цвета**;
7. Положительный контрольный образец (**K+ IgM**) – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела классов M к лямблиозу - прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **синего** цвета;
8. Положительный контрольный образец (**K+G/A**) – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела классов G и A к лямблиозу - прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **красного** цвета;
9. Отрицательный контрольный образец (**K-**) - инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая специфических антител к лямблиозу – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **желтого** цвета;
10. Хромоген – тетраметилбензидин - субстрат (**ТМБ –субстрат**) – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;
11. **Стоп-реагент** – прозрачная бесцветная жидкость.

Тест-система " Лямблиоз- AGM" рассчитана на 96 определений, включая контрольные образцы.

### Назначение

Выявление индивидуальных антител класса G, M, A к *Lamblia intestinalis* в сыворотке (плазме) крови человека.

### Способ применения

**Предупреждение!** Несмотря на то, что тест-система "Лямблиоз - AGM" является полностью биологически безопасной, с ней следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом:

- все использованные материалы подвергать обработке раствором спирта этилового с объемной долей 70 % или раствором водорода перекиси с массовой долей 6 % с последующей выдержкой при температуре от 20 до 25 °С не менее 2 ч.

**Внимание!** При проведении анализа нельзя использовать компоненты 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 1 моль/л или кислоты соляной 1 моль/л с последующей отмывкой водой дистиллированной.

### 1 Приготовление реагентов и исследуемого материала

#### 1.1 Приготовление ФСБ-Т

При наличии во флаконе с ФСБ-Т осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре (37±1) °С до полного растворения солей.

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

Хранение: неиспользованный концентрат ФСБ-Т в течение срока годности набора при температуре

от 2 до 8 °С, раствор ФСБ-Т – в течение месяца при температуре от 2 до 8 °С.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимое количество ФСБ-Т для данной серии в соответствии с таблицей

		Количество используемых стрипов											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Объем, мл	Концентрат ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
	Вода дистил- лированная, 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

#### 1.2 Подготовка РБР-С, PKr-IgG, PKr-IgM, PKr-IgA, ТМБ-субстрат

РБР-С, PKr-IgG, PKr-IgM, PKr-IgA, ТМБ-субстрат – готовы к использованию

Хранение: неиспользованные РБР-С, PKr-IgG PKr-IgM, PKr-IgA, ТМБ-субстрат хранят в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

1.3 Подготовка контрольных сывороток .  
K-, (K+ IgM), (K+G/A) - готовы к использованию.

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

1.4 Подготовка стоп-реагента  
Стоп-реагент готов к использованию.  
Хранение: не ограничено.

### **2 Подготовка исследуемых сывороток**

Для выявления антител класса G, M, A к *Lambliа intestinalis* использовать сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С или в течение трех месяцев при температуре минус 20 °С.

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 50 мкл.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. 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 с погрешностью измерения объема не более 2 %.

### **3 Проведение ИФА**

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до 25° С.

#### **I. Выявление антител класса IgG**

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до 25° С.

3.1.1. Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3.1.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл (K+G/A), в две другие лунки планшета - по 100 мкл K-. В остальные лунки планшета внести по 100 мкл РБР-С. При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для K-, (K+G/A) - по одной лунке.

В остальные лунки планшета внести по 10 мкл исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

3.1.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.1.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов G человека (PKг-IgG) **зелёного цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)° С.

3.1.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.1.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ- субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре (37±1)° С.

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

#### **Учет результатов**

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с K- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, в лунках с K+ среднее значение ОП (ОПК+) не менее 1,0.

Рассчитывают ОПкрит. по формуле:

$$\text{ОПКрит.} = \text{ОПК(ср.)} + 0,25,$$

где ОПК(ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл. ≤ 0,9хОПКрит, то результат анализа считают отрицательным, IgG к лямблиозу не определены.

Если ОПиссл. попадает в интервал от 0,9хОПКрит до 1,2хОПКрит, то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл. > 1,2хОПКрит, то результат анализа считают положительным.

#### **II. Выявление антител класса IgM**

3. II.1 Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3. II.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл(K+ IgM), в две другие лунки планшета - по 100 мкл K-. В остальные лунки планшета внести по 100 мкл РБР-С. При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для K- и (K+ IgM) - по одной лунке.

В остальные лунки планшета внести по 10 мкл исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

3. II.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3. II.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов М человека (РКг-IgM) **синего цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

3. II.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3. II.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ- субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

3. II.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

#### **Учет результатов**

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, в лунках с К+ среднее значение ОП (ОПК+) не менее 0,5.

Рассчитывают ОПкрит. по формуле:

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

где ОПК-(ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл.  $\leq 0,9 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа считают отрицательным.

Если ОПиссл. попадает в интервал от  $0,9 \times \text{ОПКрит}$  до  $1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки. При повторном сомнительном результате необходимо проанализировать сыворотку, полученную через 10-15 дней на наличие IgM и IgG антител и параллельно с 1-м образцом сыворотки проследить увеличение концентрации IgM. При увеличении концентрации IgM или выявлении IgG антител результат считают положительным.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл.  $> 1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа считают положительным. При анализе парных сывороток для контроля изменения концентрации IgM или наличия сероконверсии оба образца должны быть протестированы в дубликate одновременно во время одной постановки.

### **III. Выявление антител класса IgA**

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до  $25^{\circ}\text{C}$ .

3. III.1. Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3. III.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл (К+G/A), в две другие лунки планшета - по 100 мкл К-. В остальные лунки планшета внести по 100 мкл РБР-С. *При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- и (К+G/A) - по одной лунке.*

В остальные лунки планшета внести по 10 мкл исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

3. III.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3. III.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов А человека (РКг-IgA) **жёлтого цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

3. III.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3. III.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ- субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

3. III.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

#### **4. Учет результатов**

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, в лунках с К+ среднее значение ОП (ОПК+) не менее 1,0.

Рассчитывают ОПкрит. по формуле:

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

где ОПК-(ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл.  $\leq 0,9 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа считают отрицательным, IgA к лямблиозу не определены.

Если ОПиссл. попадает в интервал от  $0,9 \times \text{ОПКрит}$  до  $1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки.

Если ОПиссл.  $> 1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа исследуемого образца считают положительным. Присутствие IgA к лямблиозу отражает наличие текущей или реинфекции.

### **Форма выпуска**

Тест-систему "Лямблиоз- AGM" выпускают в виде набора, упакованного в коробку из картона, куда вкладывают инструкцию.

Набор состоит из следующих компонентов: иммуносорбент, запаянный в пластиковый пакет, – 1 шт.; ФСБ-Т, 25х концентрат, по 26 мл - 1 флакон; РБР-С по 12 мл - 1 флакон; РКг-IgG по 12 мл – 1 флакон; РКг- IgA – 1 флакон по 12 мл; РКг- IgM – 1 флакон по 12 мл; ТМБ-субстрат по 12 мл - 1 флакон; (K+ IgM ) по 1,5 мл – 1 флакон; (K+G/A) по 1,5 мл – 1 флакон; К- по 2.5 мл - 1 флакон; стоп-реагент по 6 мл - 1 флакон.

### **Срок годности, условия хранения и транспортирования**

Срок годности набора 9 месяцев.

Хранение при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование производить при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27 °С в течение 5 дней.

Не допускать замораживания.

## 7. Краткая схема проведения ИФА.

№ п/п	Наименование операции	Время и температура инкубации
1.	Промыть однократным ФСБТ – 1 раз	Комнатная температура (18- 25° С)
2.	Внести по 100 мкл К+, К-, СК+ по 100 мкл РБР-С и а.) для выявления антител класса IgG внести по 10 мкл анализируемых образцов., б.) для выявления антител класса IgM внести по 10 мкл анализируемых образцов., в.) для выявления антител класса IgA внести по 10 мкл анализируемых образцов.	30 мин. при температуре 37° С
3.	Промыть однократным ФСБТ – 5 раз	Комнатная температура (18- 25° С)
4.	Внести по 100 мкл: а.) для выявления антител класса IgG внести по 100 мкл раствора конъюгата PKg-IgG зелёного цвета., б.) для выявления антител класса IgM внести по 100 мкл раствора конъюгата PKg-IgM синего цвета., в.) для выявления антител класса IgA внести по 100 мкл раствора конъюгата PKg-IgA жёлтого цвета.	30 мин. при температуре 37° С
5.	Промыть однократным ФСБТ – 5 раз	Комнатная температура (18- 25° С)
6.	Внести по 100 мкл ТМБ-субстрата	15 мин. при температуре 37° С
7.	Внести по 50 мкл стоп-реагента	Комнатная температура (18- 25° С)
8.	Измерить ОП при 450 нм	Комнатная температура (18- 25° С)

## 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С ИФА ТЕСТ-СИСТЕМАМИ

### 7.1. Общие рекомендации.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

работать в резиновых перчатках;

не пипетировать растворы ртом;

все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).

Необходимо предъявлять высокие требования к чистоте лабораторной посуды, наконечников, ванночек и т.п., поскольку даже следы применяемых дезинфицирующих и моющих средств приводят к искажению результатов ИФА.

– Предпочтительно использование одноразовой посуды.

– При многократном использовании контейнера или ванночки для компонента их следует использовать всегда для одного и того же реагента, при повторном применении следует тщательно промыть дистиллированной водой до и после каждого использования.

– Для работы с набором следует использовать

дистиллированную воду высокого качества, так как компоненты набора очень чувствительны к микробиологическому загрязнению, хлорноватистой кислоте и ароматическим хлорсоединениям, ионам металлов, зачастую находящихся в воде.

– При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий.

– При использовании автоматического вошера или гребёнки ёмкость и шланги для промывочного раствора рекомендуется 1 раз в неделю обрабатывать 70%-ным спиртом с последующей отмывкой дистиллированной водой.

### 7.2. Требования к анализируемым образцам.

· Для проведения ИФА не рекомендуется использовать гемолизированные, гиперлипидные или повторно замороженные сыворотки.

· Допускается хранение образцов сывороток при 2-8°С в течение 48 часов, либо при температуре минус 20°С в течение 3 месяцев.

· После размораживания образцы тщательно перемешать.

· При необходимости образцы очистить центрифугированием при 5-10 тыс.об/мин.

### 7.3. Возможные причины снижения чувствительности.

– Уменьшение времени инкубации (как правило, субстратной реакции).

– Использование загрязнённой посуды и наконечников.

– Замачивание посуды и наконечников в перекиси водорода или хлорсодержащих растворах без последующего кипячения в процессе мытья.

– Плохая отмывка после инкубации сывороток.

– Растворы, не нагретые перед постановкой до комнатной температуры.

– Размещение планшет в термостате стопкой.

– Низкая температура в лабораторных комнатах (ниже +18°С).

– Нарушение правил и сроков хранения вскрытых компонентов при дробном использовании набора.

### 7.4. Возможные причины ложноположительных результатов из-за погрешностей постановки

– Плохая отмывка на стадии конъюгата.

– Длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации.

– Контаминированный вошер, гребёнка или низкого качества дистиллированная вода.

– Неправильная работа с пипетками.

– Многократное использование наконечников и посуды для ТМБ-субстрата.