

ВЕКТОР

**БЕСТ**

---

---

Набор реагентов  
для иммуноферментного выявления  
иммуноглобулинов класса М  
к антигенам лямблий

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

---

**Лямблия – IgM – ИФА – Бест**

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**D-3554**



## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «Лямблия-IgM – ИФА – Бест» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Набор реагентов может быть использован при диагностике острого лямблиоза в комплексе с другими методами, при изучении патогенеза и иммуногенеза лямблиоза в клинических и научно-исследовательских лабораториях.

**1.3.** Набор реагентов рассчитан на проведение 48 анализов в разведении 1:100 при нанесении образцов в дублях или 12 анализов в последовательных двукратных разведениях сывороток от 1:100 до 1:12800, включая контроли.

## **2. ПРИНЦИП МЕТОДА**

Метод определения иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. Специфическими компонентами набора реагентов являются антигены лямблий, иммобилизованные в лунках планшетов, пероксидазный конъюгат антител к IgM человека, положительный и отрицательный контрольные образцы.

На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами лямблий происходит связывание специ-

фических антител и образование комплекса «антиген/антитело» на поверхности лунок.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата 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 – тетраметилбензида. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волна в диапазоне 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса M к антигенам лямблий в анализируемом образце сыворотки.

### 3. СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – планшет разборный с иммобилизованными антигенами лямблий – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный ( $K^+$ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный ( $K^-$ ; прозрачная жидкость желтого цвета) – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат, концентрат (иммуноглобулины против IgM человека, меченные пероксидазой хрена; прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 1,5 мл;

- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС; прозрачная жидкость малинового цвета) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС; прозрачная жидкость зеленого цвета) – 1 фл., 28 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жидкость, допускается выпадение осадка солей) – 1 фл., 28 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 1 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

#### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**4.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

**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 пораженный участок большим количеством проточной воды.*

**4.3.** При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического 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 образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или возбудитель любой другой инфекции.

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

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

**4.7.** Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные сред-

ства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

**4.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:**

– не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

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

– *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывать шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и рабочего раствора ТМБ; **обращаем Ваше внимание** на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего содержимого флаконов с СБР и ТМБ, поэтому необходимо протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом перед внесением ТМБ в СБР;

– проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;

– не изменяйте протокол исследования;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.



## **5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:**

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промыватель автоматический для планшет;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- вода дистиллированная.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

**6.1.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

**6.2.** Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

**6.3.** Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

**6.4.** Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%. Следует обратить внимание на точное дозирование и тщательное перемешивание сывороток с раствором, используемым для их разведения. От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

### 7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

### 7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

*Хранение:* при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

#### 7.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА

Рабочий буферный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз.

Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

*Хранение:* не более 5 суток при 2–8°C.

#### 7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЬЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в чистый флакон или пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество рабочего буферного раствора, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

*Хранение:* до 3 часов при 18–25°C.

#### 7.6 ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Положительный ( $K^+$ ) и отрицательный ( $K^-$ ) контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

**Таблица расхода компонентов набора реагентов**

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий буферный раствор (РБР)		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ	
	ФСБ-Т, концентрат, мл	Вода дистиллированная, мл	Конъюгат, концентрат, мл	РБР, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, 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 ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток, используя стрипы дополнительного планшета. Для этого 10 мкл цельной сыворотки анализируемого образца добавляют к 90 мкл РПРС и тщательно перемешивают. При этом

малиновый цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, данная сы-воротка может дать неправильный результат.

Хранение: до 3 ч при температуре от 18 до 25°C.

## 7.8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

**Внимание!** *Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

*Допустимо голубое окрашивание рабочего раствора ТМБ, которое не оказывает влияния на результаты анализа.*

Хранение: не более 3 часов при 18–25°C в темноте.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести контрольные образцы:

- 1 лунка – 100 мкл  $K^+$ ;
- 2 лунки – по 100 мкл  $K^-$ .

Например, в лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл  $K^-$ . В лунку А-1 – 100 мкл  $K^+$ .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (п. 7.7.), тщательно перемешать; таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

При определении титра IgM тестирование исследуемых сывороток производят в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В лунки горизонтального ряда А внести по 200 мкл разведения 1:100 исследуемых сывороток, приготовленных, как описано выше. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток. Каждую сыворотку 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 дезраствор по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл. Контрольные образцы внести как указано выше.

Отрезать пленку требуемого размера. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

**8.2.** По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (п. 7.4.) с помощью промывочного устройства. При этом в каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

**8.3.** Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.5.).

Отрезать пленку требуемого размера. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

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

**8.4.** По окончании инкубации лунки стрипов промыть 5 раз как описано в п. 8.2.

**8.5.** Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидаина (п. 7.8) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при 18–25°C.



*Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**8.6.** Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента (при этом цвет раствора в лунках меняется на желтый).

## **9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности при одной длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

## 10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

*Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл  $K^+$ ,  $K^-$ ;  
по 90 мкл РРС и по 10 мкл  
предварительно разведенных  
исследуемых сывороток.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим буферным раствором,  
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора  
конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим буферным раствором,  
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора  
ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реактента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная  
длина волны 620–655 нм.

## 11. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

11.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

11.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ( $ОП_{ср} K^-$ ) не должно превышать 0,25 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,5 ед. опт. плотн.

11.3. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 11.2.

11.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ( $ОП_{д}$ ) по формуле:

$$ОП_{д} = ОП_{ср} K^- + 0,2.$$

11.5. Исследуемую сыворотку расценивают как **положительно** реагирующую, если соответствующее ее разведению 1:100 значение  $ОП_{иссл.}$  больше или равно  $ОП_{д}$ .

Результат анализа считать **отрицательным**, если  $ОП_{иссл.} \leq 0,85 \times ОП_{д}$ .

Если  $ОП_{иссл.}$  попадает в диапазон от  $0,85 \times ОП_{д}$  до  $ОП_{д}$  – результат анализа следует считать **сомнительным** и необходим повторный анализ вновь взятого образца сыворотки крови человека.

За титр положительной сыворотки принимают ее наибольшее разведение, при котором

оптическая плотность сыворотки равна или превышает расчетное значение ОП<sub>д</sub>.

**11.6.** Для оценки изменения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови больного лямблиозом рекомендуется использовать коэффициент позитивности ( $K_{\text{позит}}$ ), который показывает во сколько раз величина оптической плотности исследуемого образца превышает значение расчетной диагностической оптической плотности:

$$K_{\text{позит}} = \frac{\text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}}}{\text{ОП}_{\text{д}}}$$

**11.7.** Лямблии обитают в проксимальном отделе тонкой кишки, поэтому для лямблиоза характерно развитие местных иммунологических реакций. Однако, и в сыворотках крови инвазированных лямблиями людей выявляются антитела к антигенам лямблий, относящиеся к различным классам иммуноглобулинов. Показано, что попадание антигенов лямблий в периферическую кровь увеличивается при резорбции слизистой оболочки кишечника, проницаемость которой, как известно, возрастает при ее воспалении. В связи с этим выявление IgM к антигенам лямблий в сыворотке крови может свидетельствовать о наличии острого лямблиоза, диагностика которого возможна на 10–14 день от начала инвазии.

**11.8.** При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно

отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

## **12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**12.1.** Набор «Лямблия – IgM – ИФА – Бест» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (9 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание не допускается.

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

**12.3.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества набора реагентов,**  
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:  
630559, Новосибирская обл.,  
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,  
тел. (383) 336-73-46,  
тел./факс (383) 332-67-49,  
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться в от-  
деление диагностики паразитарных инфекций,  
тел. (383) 336-55-56

08.09.10.



**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086  
на производство, хранение и реализацию  
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ  
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ  
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D  
Инфекции, передаваемые  
половым путем  
ВИЧ-инфекция  
TORCH-инфекции  
Клещевой энцефалит  
Паразитарные болезни  
Диагностика беременности  
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество  
и точный результат  
для Вашей лаборатории!***

**Наш адрес:** 630117, Новосибирск-117, а/я 492  
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)  
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,  
332-67-49, 332-67-52  
*E-mail:* [vbmarket@vector-best.ru](mailto:vbmarket@vector-best.ru)  
Internet: [www.vector-best.ru](http://www.vector-best.ru)