

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G и A к *Lamblia intestinalis*

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

Набор состоит из 9 реагентов:

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

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

### Назначение

Тест-система предназначена как для выявления индивидуальных специфических антител класса G или класса A, так и для одномоментного выявления антител класса IgG и IgA к лямблиозу в сыворотке (плазме) крови человека

### Способ применения

#### 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  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$  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.

При использовании одного или нескольких стрипов планшета необходимое количество ФСБ-Т готовится в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

		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, РКг-IgG, РКг-IgA, K+ (IgG/IgA), ТМБ-субстрата

РБР-С, РКг-IgG, РКг-IgA, K+ (IgG/IgA), ТМБ-субстрат – готовы к использованию

Хранение: неиспользованные РБР-С, РКг-IgG, РКг-IgA, K+ (IgG/IgA), ТМБ-субстрат хранят в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

**При работе с ТМБ-субстратом и раствором конъюгата (РКг) необходимо отбирать раствор непосредственно из флакона новыми наконечниками.**

##### 1.3 Подготовка стоп- реагента

Стоп- реагент готов к использованию.

Хранение: не ограничено.

#### 2. Подготовка исследуемых сывороток

Для выявления антител класса можно 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.

### 3. Проведение ИФА

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

#### I. Выявление антител класса IgG

I.3.1 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.

I.3.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл К+(**IgG/IgA**), 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+ - по одной лунке.

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

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

I.3.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

I.3.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов G человека (РКг-IgG) **зелёного цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)° С.

I.3.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

I.3.6. 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.

I.3.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

#### II. Выявление антител класса IgA

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

II.3.1 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.

II.3.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл К+(**IgG/IgA**), 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+ - по одной лунке.

В лунки планшета с РБР-С 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.

II.3.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

II.3.4. 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±1)° С.

II.3.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

II.3.6. 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.

II.3.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

#### III. Выявление антител классов IgG и IgA

III.3.1 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.

III.3.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые стрипы планшета.

Например, при использовании 2-х стрипов планшета - Стрип №1 использовать для выявления **антител класса IgG**, Стрип №2 использовать для выявления **антител класса IgA**

Для этого в лунки А1 и А2 внести по 100 мкл К+ (**IgG/ IgA**), в лунки В1 и В2 внести по 100 мкл К-, В остальные лунки стрипов планшета внести по 100 мкл РБР-С. В остальные лунки стрипа №1 внести по **10 мкл** сывороток для выявления антител класса **IgG** и в остальные лунки стрипа №2 по **10 мкл** исследуемых сывороток для выявления антител класса **IgA**. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

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

III.3.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п. III.3.1.

III.3.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета:

А) стрипа №1 внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов G человека (РКг-IgG ) **зелёного цвета**.

Б) стрипа №2 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  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ .

Ш.3.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п. Ш.3.1.

Ш.3.6. 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  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ .

Ш.3.7. 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 значение ОП в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, в лунках с К+ (**IgG/ IgA**) среднее значение ОП (ОПК+) не менее 0,5.

**Рассчитывают ОПКрит. по формуле:**

**А) Для выявления антител класса IgG**

**ОПКрит. = ОПК-(ср.) + 0,2,**

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

Если значение оптической плотности исследуемого образца  $\text{ОП}_{\text{иссл.}} \leq 0,9 \times \text{ОПКрит.}$ , то результат анализа считают отрицательным. Если  $\text{ОП}_{\text{иссл.}}$  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  $\text{ОП}_{\text{иссл.}} > 1,2 \times \text{ОПКрит.}$ , то результат анализа исследуемого образца считают положительным.

**Б) Для выявления антител класса IgA**

**ОПКрит. = ОПК-(ср.) + 0,2,**

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

Если значение оптической плотности исследуемого образца  $\text{ОП}_{\text{иссл.}} \leq 0,9 \times \text{ОПКрит.}$ , то результат анализа считают отрицательным. Если  $\text{ОП}_{\text{иссл.}}$  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  $\text{ОП}_{\text{иссл.}} > 1,2 \times \text{ОПКрит.}$ , то результат анализа исследуемого образца считают положительным.

#### 5. Форма выпуска

Тест-систему выпускают в виде набора, упакованного в коробку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

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

#### 6. Срок годности, условия хранения и транспортирования

Срок годности набора 12 месяцев.

Хранение при температуре от 2 до  $8^\circ\text{C}$ .

Транспортирование производить при температуре от 2 до  $8^\circ\text{C}$ . Допускается транспортирование при температуре не выше  $+27^\circ\text{C}$  в течение 5 дней.

Не допускать замораживания.