УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» февраля 2024 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий в сыворотке крови
«Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ»
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий в сыворотке крови «Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного определения иммуноглобулинов класса М (IgM) к антигенам лямблий в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Набор может быть использован как вспомогательное средство при диагностике лямблиоза.

1.2. Комплект 1 рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ.

На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сыворотки крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами лямблий происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. На второй стадии конъюгат моноклональных антител к IgM человека с пероксидазой хрена взаимодействует с комплексами «антиген-антитело». При инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело-конъюгат». Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM - антител к антигенам лямблий в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание*	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными антигенами лямблий	1 шт.
Положительный контрольный образец ($К^+$) *Содержит IgM к антигенам лямблий.* *Содержит натрия азид (0,1 %).*	1 фл., 1,5 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$) *Не содержит IgM к антигенам лямблий.* *Содержит натрия азид (0,1 %).*	1 фл., 2,5 мл
Конъюгат *Конъюгат моноклональных антител к IgM человека с пероксидазой хрена.*	1 фл., 13,0 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Содержит натрия мертиолят (0,015 %).	
Раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) *Содержит ProClin 300 (0,02 %).*	1 фл., 10,0 мл
Раствор для разведения сывороток (РРС) *Содержит натрия азид (0,1 %).*	1 фл., 12,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25 %).*	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) *Содержит 3,3′,5,5′ - тетраметилбензидин (0,025 %).*	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9 %).*	1 фл., 12,0 мл
Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
Пленки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Титр стандартного образца предприятия СОП$^+$ (№ 05-2-18) должен быть не менее 1:800.

3.2. Диагностическая чувствительность оценивалась при клинических исследованиях:

– 45 серопозитивных образцов сыворотки крови и составила 100% (интервал 93,6%-100% с доверительной вероятностью 90%);

Диагностическая специфичность оценивалась при клинических исследованиях:

– 45 серонегативных образцов сыворотки (плазмы) крови составила 100% (интервал 93,6%-100% с доверительной вероятностью 90%).

3.3. Аналитическая специфичность:

При анализе 85 образцов клинического материала, свободных от иммуноглобулинов класса М к антигенам лямблий, в том числе 73 образцов сыворотки крови пациентов, содержащих иммуноглобулины класса М к грибам рода Candida, Toxoplasma gondii, антигенам описторхисов и 12 образцов сыворотки крови пациентов, содержащих суммарные антитела к ревматоидному фактору показано отсутствие ложнопозитивных результатов.

3.4. Потенциально интерферирующие вещества – триглицериды в концентрации до 6,0 мг/мл; билирубин в концентрации до 0,4 мг/мл, гемоглобин в концентрации до 10 мг/мл – не оказывают влияния на получение правильных результатов.

3.5. Воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов, содержащих IgM к антигенам лямблий в 8 повторах каждый. Коэффициент вариации значений оптической плотности (ОП), определенных наборами (в т.ч. разными) одной серии и разных серий не превышал 13%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, натрия азид, натрия мертиолят, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.7. Противопоказания: не применимо, изделие предназначено для клинической лабораторной диагностики.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм; или автоматический ИФА-анализатор открытого типа (например: анализатор иммуноферментный автоматический «Лазурит» (Lazurite) с принадлежностями);
- термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;
- дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека.

6.3. Образцы сыворотки крови следует хранить при температуре (2–8) °С не более 5 суток, или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение. Допускается однократное замораживание. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. ***Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.***

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.

– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8)°С, использовать в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ФСБ-Т×25
и стоп-реагента при температуре (2–30)°С.

– Необходимо избегать воздействия прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

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

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30–40)°С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2–8)ºС не более 1 месяца или при температуре (18–26)ºС не более 7 суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица расхода компонентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистил. вода, мл		
1	2,0	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.4. Конъюгат

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Раствор ТМБ

Раствор ТМБ готов к использованию. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ в ванночку для реагента.

7.6. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз РПРС. Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельных образцов сыворотки, тщательно перемешать.

При разведении сыворотки красный цвет РПРС должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат.

Хранение: не более 3 ч при температуре (18–26)°С.

7.7. Контрольные образцы, стоп-реагент готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В одну лунку планшета, например, А-1, внести 100 мкл положительного контрольного образца (К+). В любые две лунки, например, В-1 и С-1, внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (К–).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.6.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

8.1.1. Определение титра исследуемых образцов.

При определении титра антител 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 (п. 7.6.), 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 растительровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в дезинфицирующий раствор по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Время внесения образцов не должно превышать 20 мин.

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1)°С.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл промывочного раствора в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать в течение 30 мин в термостате при температуре (37±1)°С.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом)***.

8.4. По окончании второй инкубации промыть лунки, как указано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (см. п. 7.5.) и инкубировать в защищенном от прямого солнечного света месте 25 мин при температуре (18–26)°С.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ)***.

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.7. Измерить величину оптической плотности (ОП) растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значения ОП в лунках с $К^-$ не более 0,3;

– значение ОП в лунке с $К^+$ не менее 0,8.

9.2. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср.}К^-$).

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$\mathbf{ОП_{крит.} = ОП_{ср.}\ К^- + 0{,}2.}$$

9.3. Результат анализа считается **положительным**, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{крит.}$.

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

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

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

9.4. За титр положительной сыворотки принимают ее наибольшее разведение, при котором $ОП_{обр.} \geq ОП_{крит.}$.

9.5. Для оценки степени позитивности положительных образцов может быть рассчитан коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$\mathbf{КП = ОП_{обр.}/ОП_{крит.}}$$

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.2. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 26°С не более 10 суток.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

наборов по истечении срока их годности.

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

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам, касающимся качества набора
«Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ»
(комплект 1),
обращаться в АО «Вектор-БЕСТ»
по адресу:

630559, г. Новосибирская область,
р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 363-35-56.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Лямблия-IgM-ИФА-БЕСТ» (комплект 1)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл в одну лунку $К^+$ и в две лунки $К^-$;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов в остальные лунки.
Инкубировать: 30 мин, (37±1)°С.
Промыть: промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
Внести: по 100 мкл конъюгата.
Инкубировать: 30 мин, (37±1)°С.
Промыть: промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
Внести: по 100 мкл раствора ТМБ.
Инкубировать: 25 мин, (18–26)°С, в защищенном от прямого солнечного света месте.
Внести: по 100 мкл стоп-реагента.
Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

Графические символы

Символ	Описание	Символ	Описание
REF	Номер по каталогу		Осторожно!
Σ	Содержимого достаточно для проведения n тестов	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии		Предел температуры
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до …		Обратитесь к инструкции по применению
YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-35-56.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru