

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ЗАО

«Медико-биологический Союз»



М.В.Лосев

2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Мелиса Токсо-IgG»

Набор реагентов для иммуноферментного качественного и количественного определения антител класса G к *Toxoplasma gondii*

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Качественное и количественное определение антител класса G к *Toxoplasma gondii* в сыворотке, плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе в клинических и эпидемиологических исследованиях.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Набор реагентов «Мелиса Токсо-IgG» рассчитан на проведение 96 или 192 определений, включая контрольные образцы.

2.2 При исследовании небольшого количества образцов возможно проведение 12 или 24 (для разборных планшетов) независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) с применением антигена *Toxoplasma gondii* и моноклональных антител против IgG человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с антигеном *Toxoplasma gondii*, сорбированным на поверхности лунок планшета. При наличии в сыворотке специфических антител к *Toxoplasma gondii* происходит связывание их с антигеном, при этом образуются иммунные комплексы антиген-антитело.

На второй стадии анализа специфические антитела выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена.

После отмывки несвязавшихся компонентов конъюгата комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета. Концентрация специфических антител класса G к *Toxoplasma gondii* пропорциональна интенсивности окрашивания раствора в лунках планшета.

Формула количественного расчета специфической активности тестируемых образцов основана на статистическом методе приближения по двум точкам (ОПкрит. и ОП(К+ср.)) эмпирической кривой графика зависимости оптической плотности от специфической активности, которая получена при аттестации серии. Формула зависимости рекомендована Комитетом по Биостандартизации ВОЗ. В качестве эталона используется K+, который является вторичным производственным стандартом, аттестованным относительно международного стандарта ВОЗ человеческого иммуноглобулина против *Toxoplasma gondii* (NIBSC code: 01/600) с использованием программы статистической обработки результатов ИФА «Paraline v.3.0».

2.4 Набор реагентов выпускают в следующих комплектациях:

- комплект 1 для ручной постановки – на 96 определений;
- комплект 2 для ручной постановки – на 192 определения;
- комплект 3 для ручной постановки и автоматического анализатора – на 96 или 192 определения.

2.5 Состав комплектов

Наименование компонента	Комплект 1		Комплект 2		Комплект 3	
	разборный, 1 шт.	разделяемый по лункам, 1 шт.	разборный, 2 шт.	монолитный, 2 шт.	разборный, 1 шт.	разборный, 2 шт.
иммуносорбент – рекомбинантный антиген <i>Toxoplasma gondii</i> , сорбированный в лунках планшетов						
K+ – положительный контрольный образец, инактивированный – прозрачная малинового цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл) или 1 фл. (6,0 мл)	4 фл. (3,0 мл) или 2 фл. (6,0 мл)
K- – отрицательный контрольный образец, инактивированный – прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл) или 1 фл. (6,0 мл)	4 фл. (3,0 мл) или 2 фл. (6,0 мл)
Kг – конъюгат – прозрачная зеленого цвета жидкость	1 фл. (0,6 мл)	1 фл. (0,6 мл)	2 фл. (0,6 мл)	2 фл. (0,6 мл)	2 фл. (0,6 мл) или 1 фл. (1,0 мл)	3 фл. (0,6 мл) или 2 фл. (1,0 мл)
РБР-С – разводящий буферный раствор для сывороток – опалесцирующая фиолетового цвета жидкость	1 фл. (11,0 мл)	1 фл. (11,0 мл)	2 фл. (11,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	2 фл. (11,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	2 фл. (11,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	4 фл. (11,0 мл) или 2 фл. (20,0 мл)
РБР-К – разводящий буферный раствор для конъюгата – опалесцирующая зеленого цвета жидкость	1 фл. (13,0 мл)	1 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	2 фл. (13,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	2 фл. (13,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	4 фл. (13,0 мл) или 2 фл. (20,0 мл)
ТМБ – тетраметилбензидин – прозрачная бесцветная или светло- желтого цвета жидкость	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)	2 фл. (0,5 мл) или 1 фл. (1,0 мл)	2 фл. (0,5 мл) или 1 фл. (1,0 мл)	2 фл. (0,5 мл) или 1 фл. (1,0 мл)	4 фл. (0,5 мл) или 2 фл. (1,0 мл)
БРС – буферный раствор субстрата – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13,0 мл)	1 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	4 фл. (13,0 мл) или 2 фл. (20,0 мл)
РХ – раствор хромогена (вместо БРС и ТМБ) – прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13,0 мл)	1 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)	4 фл. (13,0 мл) или 2 фл. (20,0 мл)
ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно- солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость, допускается выпадение осадка	1 фл. (26,0 мл)	1 фл. (26,0 мл)	2 фл. (26,0 мл)	2 фл. (26,0 мл)	2 фл. (26,0 мл) или 1 фл. (50,0 мл)	4 фл. (26,0 мл) или 1 фл. (75,0 мл)
стоп-реагент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)	2 фл. (12,0 мл) или 1 фл. (20,0 мл)
инструкция по применению с приложением	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в набор вкладывают: клейкую пленку для планшета, пластиковые емкости для растворов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор реагентов выявляет антитела класса G к *Toxoplasma gondii* в положительных сыворотках рабочей панели «РП-АТ-G(+/-)T.gondii», аттестованной ОБТК

предприятия, и не дает ложноположительных результатов при исследовании сывороток этой же панели, не содержащих антитела к *Toxoplasma gondii*.

3.2 Чувствительность. Положительные сыворотки рабочей панели «РП-АТ-G(+/-)T.gondii», аттестованной ОБТК предприятия, имеют ОП выше (ОП_{крит.} + 0,050). Минимальная достоверная концентрация антител класса G к *Toxoplasma gondii*, определяемая набором реагентов, – 15 МЕ/мл.

3.3 Специфичность. Отрицательные сыворотки рабочей панели «РП-АТ-G(+/-)T.gondii», аттестованной ОБТК предприятия при контроле на наборе реагентов «Мелиса Токсо-IgG», имеют ОП меньше (ОП_{крит.} – 0,050).

3.4 Открытие. Значение «открытия» при смешивании равных объемов К+ и контрольной сыворотки с минимальной концентрацией антител к *Toxoplasma gondii* находится в интервале от 90 % до 110 %.

3.5 Линейность. Отклонение значения концентрации антител класса G к *Toxoplasma gondii* для каждой сыворотки находится в интервале от 90 % до 110 % диапазона значений концентрации от 15 до 200 МЕ/мл.

3.6 Воспроизводимость. Коэффициент вариации концентрации в одном и том же образце не более 8 %.

3.7 Интерсепт. Значение 50 % «интерсепта» должно находиться в интервале (40 ± 20) МЕ/мл.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 26 (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором реагентов 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.).

4.3 Все компоненты набора реагентов, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания стоп-реагента на кожу и слизистые. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4 При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки), т.к. контрольные образцы и исследуемые сыворотки следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собрать в специальном контейнере и затем обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором перекиси водорода (ТУ 2123-002-57856778) с массовой долей 6 % при комнатной температуре не менее 2 ч.

4.6 Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором этилового спирта (ГОСТ Р 51652) с объемной долей 70 % в течение нескольких секунд.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Устройство для промывки микропланшетов или восьмиканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;

- пипетка полуавтоматическая одноканальная с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей от 40 до 200 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °C;

- фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 650 нм;
- анализатор автоматический открытого типа;
- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 °С до 8 °С;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная;
- спирт этиловый;
- водорода перекись.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для проведения анализа использовать образцы сыворотки (плазмы) крови человека объемом не менее 15 мкл.

6.2 Для выявления антител класса G к *Toxoplasma gondii* использовать сыворотку, плазму крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся не более 7 суток при температуре от 2 °С до 8 °С или не более шести месяцев при температуре минус 20 °С.

6.3 Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа:

- при проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов реагентов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, за исключением ФСБ-Т(х25) и стоп-реагента, которые взаимозаменяемы во всех наборах реагентов производства ЗАО «МБС»;
- для приготовления растворов использовать чистую посуду;
- в процессе промывки полностью заполнять лунки планшета без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с;
- не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов;
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором спирта этилового с объемной долей 70 %, не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для рабочего раствора ФСБ-Т и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста.

7.1 Подготовка компонентов набора

• Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

• Для отбора исследуемых проб и реагентов использовать автоматические дозаторы с погрешностью измерения объема не более 3 %.

• Содержимое флаконов с образцами сывороток и реагенты перед исследованием тщательно взболтать.

Т а б л и ц а 1 – Расход компонентов набора реагентов для постановки анализа на одном планшете

Компонент	Количество используемых стрипов, шт.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Объем, мл	комплект 1, комплект 2												
	ФСБ-Т(х25)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	26,0
	Вода	до	до	до	до	до	до	до	до	до	до	до	до
	очищенная	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	650
	РБР-К, БРС	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	13,0
	Кг, ТМБ	V/13	2V/13	3V/13	4V/13	5V/13	6V/13	7V/13	8V/13	9V/13	10V/13	11V/13	V
	комплект 3												
	ФСБ-Т(х25)	4,0/ 6,0	8,0/ 12,0	12,0/ 18,0	16,0/ 24,0	20,0/ 30,0	24,0/ 36,0	28,0/ 42,0	32,0/ 48,0	36,0/ 54,0	40,0/ 60,0	44,0/ 66,0	50,0/ 52,0/ 75,0
	Вода	до	до	до	до	до	до	до	до	до	до	до	до
	очищенная	100/ 150	200/ 300	300/ 450	400/ 600	500/ 750	600/ 900	700/ 1050	800/ 1200	900/ 1350	1000/ 1500	1100/ 1650	1250/ 1300/ 1875
РБР-К, БРС	1,6	3,3	5,0	6,6	8,3	10,0	11,6	13,3	15,0	16,6	18,3	20,0/ 26,0	
Кг, ТМБ	V/12	V/6	V/4	V/3	5V/12	V/2	7V/12	2V/3	3V/4	5V/6	11V/12	V	

7.1.1 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т (для промывки планшетов)

При наличии во флаконе с ФСБ-Т(х25) осадка флакон с концентратом выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т(х25) перенести в мерный цилиндр и разбавить в 25 раз водой очищенной.

В случае использования для постановки ИФА одного или нескольких стрипов планшета в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 1.

Хранение: рабочий раствор ФСБ-Т не более 12 ч при температуре от 17 °С до 27 °С, не более 7 суток при температуре от 2 °С до 8 °С; неиспользованный ФСБ-Т(х25) - в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.2 Подготовка РБР-С, РБР-К, БРС, РХ

РБР-С, РБР-К, БРС, РХ готовы к использованию.

В РБР-С и РБР-К возможно выпадение осадка. Перед использованием тщательно перемешать.

Хранение: неиспользованные РБР-С, РБР-К, БРС, РХ в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.3 Подготовка контрольных образцов

К+ и К- готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные К+ и К- в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора Кг

Рабочий раствор Кг готовить непосредственно перед использованием.

Из флакона с Кг отобрать указанный на этикетке объем (V) и перенести во флакон с РБР-К. Раствор тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимые объемы РБР-К и Кг в соответствии с таблицей 1.

Хранение: рабочий раствор Кг не более 15 мин при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованный Кг - в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.5 Приготовление рабочего раствора ТМБ

В случае кристаллизации ТМБ флакон с реагентом выдержать в течение 3 - 5 мин при температуре 37 °С до полного растворения ТМБ.

Рабочий раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием в защищенном от света месте.

Из флакона с ТМБ отобрать указанный на этикетке объем (V) и перенести во флакон с БРС. Раствор осторожно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимые объемы БРС и ТМБ в соответствии с таблицей 1.

Хранение: рабочий раствор ТМБ не более 20 мин при температуре от 17 °С до 27 °С в защищенном от света месте, неиспользованный ТМБ - в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.6 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию

Хранение: после вскрытия упаковки неиспользованные стрипы планшета - в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 месяцев.

7.1.7 Подготовка стоп-реактанта

Стоп-реактент готов к использованию.

Хранение: неиспользованный стоп-реактент в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2 Проведение ИФА

7.2.1 Проведение ИФА при ручной постановке (комплект 1, комплект 2)

- Время внесения в лунки планшета контрольных образцов и исследуемых сывороток не должно превышать 10 мин.

- Время внесения в лунки планшета рабочего раствора Кг не должно превышать 5 - 7 мин.

- При постриповой постановке анализа сохраняется порядок внесения контрольных образцов.

7.2.1.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов планшета вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с силикагелем.

7.2.1.2 В лунку планшета A1 и в две последние лунки в данном анализе внести по 100 мкл К+, в лунки B1 и C1 внести по 100 мкл К-. В лунку D1 внести 100 мкл РБР-С для контроля Кг.

В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С, затем добавить по 10 мкл исследуемых сывороток. Содержимое лунок перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения К+, К-, РБР-С и исследуемых образцов (см. 7.3.1).

7.2.1.3 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.4 По окончании инкубации содержимое лунок удалить и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку планшета от 250 до 300 мкл раствора, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. Остатки раствора из лунок удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.1.5 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора Кг (приготовление см. 7.1.4).

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения рабочего раствора Кг (см. 7.3.1).

7.2.1.6 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.7 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т (см. 7.2.1.4).

7.2.1.8 Внести в каждую лунку планшета, в зависимости от комплектации набора, или по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (приготовление см. 7.1.5) или по 100 мкл РХ.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РХ (см. 7.3.2).

7.2.1.9 Планшет заклеить клейкой пленкой и поместить на 20 мин в защищенное от света место при температуре от 20 °С до 25 °С.

7.2.1.10 Остановить реакцию внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.2 Проведение ИФА на автоматическом анализаторе открытого типа (комплект 3)

7.2.2.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов планшета вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с силикагелем.

7.2.2.2 Приготовить рабочий раствор ФСБ-Т (см. 7.1.1).

7.2.2.3 Поместить в анализатор планшет-иммуносорбент, рабочие растворы, реагенты, К-, К+ и исследуемые образцы.

7.2.2.4 Задать программу проведения ИФА

Внесение растворов	в лунку А1 и в две последние лунки в данном анализе - по 100 мкл К+; в лунки В1 и С1 - по 100 мкл К-; в лунку D1 - 100 мкл РБР-С для контроля Кг; в остальные лунки планшета - по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл исследуемых сывороток
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С
Промывка	5 раз рабочим раствором ФСБ-Т объемом от 250 до 300 мкл
Внесение раствора	по 100 мкл рабочего раствора Кг
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С
Промывка	5 раз рабочим раствором ФСБ-Т объемом от 250 до 300 мкл
Внесение раствора	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (или по 100 мкл РХ)
Инкубация	20 мин при температуре от 20 °С до 25 °С
Внесение раствора	по 50 мкл стоп-реагента

7.2.2.5 Включить анализатор.

7.2.2.6 При необходимости в процессе проведения анализа допускается проведение оптического контроля точности внесения реагентов в лунки планшета (см. 7.3).

7.2.2.7 По окончании анализа прибор выдаст протокол результатов исследования.

7.3 Оптический контроль точности внесения реагентов в лунки планшета

7.3.1 При проведении спектрофотометрического контроля при длине волны 450 нм:

– оптическая плотность (ОП) лунок, содержащих РБР-С и исследуемый образец, должна быть более 0,100 о.е.;

– ОП лунок, содержащих К+, должна быть более 0,200 о.е.;

– ОП лунок, содержащих К-, должна быть более 0,300 о.е.;

– ОП лунок, после внесения рабочего раствора Кг должна быть более 0,150 о.е.

7.3.2 При проведении спектрофотометрического контроля лунок после внесения РХ ОП должна быть более 0,080 о.е. при длине волны 490 нм.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В случае использования для проведения ИФА рабочего раствора ТМБ измерить величину ОП раствора в лунках планшета на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задать по воздуху. Время между остановкой реакции и измерением ОП должно быть не более 10 мин.

В случае использования РХ для проведения ИФА измерить ОП раствора в лунках планшета на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне от 620 до 700 нм. Допускается измерение ОП при одной длине волны – 450 нм. Нулевой уровень («бланк») установить по воздуху. Время между остановкой реакции и измерением ОП должно быть не более 40 мин.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

– значения ОП в каждой из лунок с К+ (ОПК+) находятся в интервале от 0,400 о.е. до 2,800 о.е.;

– среднее значение ОП в лунках с К- (ОПК-ср.) менее 0,200 о.е.;

– значение ОП в лунке с контролем Кг (ОПКг) менее или равно 0,100 о.е.

1 Качественное определение

Рассчитать ОПкрит. по формуле 1

$$\text{ОПкрит.} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,2, \quad (1)$$

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

Результаты теста считать положительными, если ОП исследуемой сыворотки больше (ОПкрит. + 0,05).

Результаты теста считать отрицательными, если ОП исследуемой сыворотки меньше (ОПкрит. – 0,05).

Интервал (ОПкрит. ± 0,05) является областью неопределенных значений («серой зоной»).

2 Количественное определение

Для образцов, давших положительный результат, вычислить концентрацию антител класса G к *Toxoplasma gondii* образца (Собр.) в МЕ/мл.

Для образцов, ОП которых превышает 2,800 о.е., вычислить Собр. можно только после исследования их в более высоких конечных разведениях (1:20 или 1:40). Для этого образец сыворотки необходимо предварительно развести рабочим раствором ФСБ-Т в 2 или 4 раза и далее исследовать как цельную сыворотку с последующим умножением конечного результата активности в МЕ/мл на 2 или 4 соответственно.

Количественное определение антител класса G к *Toxoplasma gondii* можно провести:

Вариант 1 (использование графика)

К набору прилагается график зависимости оптической плотности образцов после коррекции (ОПкор.) от концентрации антител класса G к *Toxoplasma gondii* исследуемых образцов (Собр.), построенный при контроле серии при ее выпуске.

Вначале вычислить ОПкор. по формуле 2

$$\text{ОПкор.} = \frac{(\text{ОПобр.} \times \text{ОПК} + \text{исх.})}{\text{ОПК} + \text{ср.}}, \quad (2)$$

где ОПобр. – значение ОП исследуемого образца;

ОПК+ср. – среднее арифметическое значение ОП (ОПК+) по трем лункам;

ОПК+исх. – среднее арифметическое значение ОП, полученное при контроле серии при ее выпуске (см. таблицу 2).

Затем, пользуясь графиком, найти значение Собр.

Т а б л и ц а 2 - Данные для вычисления концентрации антител класса G к *Toxoplasma gondii* образцов (Собр.)

Наименование показателя	Значение показателя
ОПК+исх.	получено при контроле серии при ее выпуске
СК+, МЕ/мл	получено при контроле серии при ее выпуске
a	получено при контроле серии при ее выпуске
b	получено при контроле серии при ее выпуске

Вариант 2 (использование формулы или компьютерного алгоритма)

Вычислить Собр. в два этапа.

1 Рассчитать промежуточный показатель (Пп) по формуле 3

$$\text{Пп} = \text{ОПобр.} \times \frac{\text{СК} +}{\text{ОПК} + \text{ср.}}, \quad (3)$$

где ОПобр. – значение ОП исследуемого образца;

СК+ – концентрация антител класса G к *Toxoplasma gondii* К+ (в МЕ/мл), значение, полученное при контроле серии при ее выпуске (см. таблицу 2, указана на флаконе с К+);

ОПК+ср. – среднее арифметическое значение ОП (ОПК+) по трем лункам.

2 Рассчитать Собр. в МЕ/мл по формуле 4

$$\text{Собр.} = 10^{(\text{Пп} - a) : b}, \quad (4)$$

где Пп – промежуточный показатель, рассчитанный по формуле 3;

a и b – константы, полученные при контроле серии при ее выпуске (указаны в таблице

2).

Пример расчета полученных данных

ОПК+ - значение ОП в лунке A1 и в двух последних лунках (например, H12 и G12), о.е.	1,308; 1,402; 1,377 – все значения находятся в интервале от 0,400 до 2,800
ОПК- - значения ОП в лунках B1 и C1, о.е.	0,041; 0,043 – оба значения меньше 0,200
ОПКг – значение ОП в лунке D1, о.е.	0,051 < 0,100
Вышеуказанные значения свидетельствуют о возможности учета результатов ИФА	
ОПкрит.	$(0,041+0,043)/2+0,2=0,242$
Верхняя граница зоны неопределенных значений, о.е.	$0,242 + 0,05=0,292$
Нижняя граница зоны неопределенных значений, о.е.	$0,242 - 0,05=0,192$
ОПК+ср. – среднее значение ОПК+ в лунке A1 и в двух последних лунках, о.е.	$(1,308+1,402+1,377)/3=1,362$
СК+ – концентрация антител класса G к <i>Toxoplasma gondii</i> К+ по Приложению (только для данного примера), МЕ/мл	58,65
ОПобр. – значение ОП исследуемого образца, о.е.	1,639
Пп – значение, рассчитанное по формуле 3	$1,639 \times 58,65 / 1,362 = 70,58$
a – значение константы по Приложению (только для данного примера)	-187
b – значение константы по Приложению (только для данного примера)	139
(Пп-a):b	$(70,58 - (-187)) / 139 = 1,85$
Собр., МЕ/мл	$10^{1,85} = 70,8$

Для упрощения процедуры вычисления концентрации антител класса G к *Toxoplasma gondii* в образцах с использованием набора реагентов «Мелиса Токсо-IgG» рекомендуется пользоваться компьютерным алгоритмом, написанным по формулам (3) и (4). Компьютерный алгоритм можно запросить у менеджеров Отдела продаж ЗАО «МБС» или воспользоваться размещенным на сайте ЗАО «МБС» по адресу <http://www.mbu.ru/support.php?ID=437>.

Интерпретация результатов

Отрицательный результат качественного анализа свидетельствует об отсутствии антител класса G к *Toxoplasma gondii*. В случае отрицательного результата анализа у беременных пациентов их следует отнести к группе риска по инфицированию возбудителем токсоплазмоза.

Положительный результат анализа свидетельствует о наличии антител класса G к *Toxoplasma gondii*. Для образцов, давших положительный результат, вычислить концентрацию антител класса G к *Toxoplasma gondii* в МЕ/мл, также рекомендуется дополнительно исследовать на наличие антител класса M и A и определить индекс авидности антител класса G.

Если концентрация антител класса G превышает 30 МЕ/мл, индекс авидности антител класса G более 60 % и антитела класса M и A отсутствуют, то вероятность острого иммунного ответа мала и риск реинфекции токсоплазмоза небольшой.

Если результат качественного анализа находится в области неопределенных значений («серой зоне») или концентрация антител класса G в образце не превышает 30 МЕ/мл, рассчитанный индекс авидности антител класса G не более 60 % и выявляются антитела класса M и A, то существует риск недавно начавшейся инфекции или реинфекции. В этом случае требуется дополнительно исследовать сыворотку в динамике и рекомендуется консультация врача-инфекциониста.

Результат проведенного анализа может быть не достоверным у пациентов прошедших процедуру переливания крови или получавших препараты крови в течение последних двух-трех месяцев, а также у лиц с различными иммунодефицитами.

10 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора реагентов 12 месяцев. Набор реагентов «Мелиса Токсо-IgG» с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор реагентов хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248 при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности.

Транспортирование наборов реагентов производить в соответствии с СП 3.3.2.1248 при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27 °С в течение 5 суток.

Замораживание наборов реагентов не допускается.

Для диагностики «in vitro».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов «Мелиса Токсо-IgG», следует обращаться на предприятие-изготовитель по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я-113, ЗАО «МБС»;

головной офис, тел./факс: 8-(383)-332-52-75;

отдел продаж, тел./факс: 8-(383)-332-81-38, 332-18-54, 339-91-97;

ОБТК, тел./факс: 8-(38341)-5-80-98, e-mail: obtk@mbu.ru

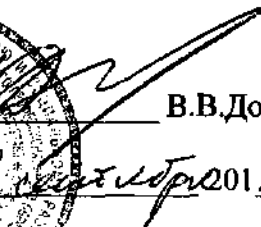
Ведущий научный сотрудник
ЗАО «МБС», к.б.н.

 И.В.Виноградов

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздравнадзор
д.м.н., профессор



 В.В.Долгов

15.08.2010 г.

