

УТВЕРЖДАЮ



Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М

к *Toxoplasma gondii* методом «захвата»

в сыворотке (плазме) крови

(Токсо-IgM-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii* методом «захвата» в сыворотке (плазме) крови «Токсо-IgM-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) методом «захвата» в сыворотке (плазме) крови человека посредством твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли, или 12 независимых постановок по 8 определений, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител к IgM человека

На первой стадии инкубации при добавлении исследуемого образца в лунки планшета происходит связывание иммуноглобулинов класса М с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки в лунки планшета вносят смесь конъюгата (моноклональные антитела против *T.gondii*, меченные пероксидазой хрена) и антигена *T.gondii*.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией И.Н. Кувшиновой и с.н.с. НИИ СД Б.Г. Некрасовым.

Во время второй инкубации связавшиеся IgM к *T.gondii* взаимодействуют с добавленными в лунки антигенами *T.gondii*, связанными в комплекс с конъюгатом моноклональных антител к антигену *T.gondii* с пероксидазой хрена.

После удаления несвязавшихся компонентов реакции, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации IgM к *T.gondii* в анализируемых образцах. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине одной волны – 450 нм.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgM к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K–) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgM к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к антигену *Toxoplasma gondii* с пероксидазой хрена – 1 флакон (13 мл);
- антиген *Toxoplasma gondii* – 1 флакон (1,3 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС), готовый для использования – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов (12 восьмилуночных стрипов), готовый для использования – 1 шт.;

Принадлежности:

- пленки для заклеивания планшета – 2 шт;
- ванночки для реагента – 2 шт;
- наконечники для дозаторов на 2–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *

3.1 Чувствительность выявления IgM к *T.gondii* – соответствие результатов выявления набором IgM к *T.gondii* требованиям стандартной панели предприятия (СПП+) (Инструкция № 05-2-295), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности для каждой пары лунок с сыворотками панели больше либо равны величине критического значения оптической плотности ($ОП_{СПП+} \geq ОП_{крит}$)

3.2 Специфичность выявления IgM к *T.gondii* – соответствие результатов выявления набором IgM к *T.gondii* требованиям стандартной панели предприятия (СПП-) (Инструкция № 05-2-82), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности для каждой пары лунок с сыворотками панели меньше величины критического значения оптической плотности ($ОП_{СПП-} < ОП_{крит}$).

3.3. Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii*: клинические испытания, проведенные на 146 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 71 пациента, показали 100 % чувствительность (интервал 95,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii*: клинические испытания, проведенные на 262 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 187 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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 исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ 287-113 («Методические указания по дезинфекции, пред-

стерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 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, вирусы гепатита или любой другой возбудитель инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;

– дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, поз-

воляющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 350 мкл;

- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба, вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа можно использовать образцы плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата, гепарина или ЭДТА.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать мутную, гемолизованную сыворотку крови.

6.3. 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 6 мес.

Следует избегать многократного замораживания/оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °C не менее 60 мин.

При детальном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть закручивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение срока годности набора.

7.2. 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.

Хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Промывочный 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: при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут.

7.4. Подготовка положительного (К+) и отрицательного (К-) контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию. К+ и К- после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2–8° C в течение всего срока годности набора.

7.5 Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), тщательно перемешать.

При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Приготовленные 10-тикратно разведенные сыворотки можно хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25°C.

7.6. Приготовление рабочего раствора смеси антигена и конъюгата.

В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество конъюгата, добавить соответствующее количество антигена, тщательно перемешать.

Приготовленную смесь антигена и конъюгата хранить не более 3 ч.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

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

Раствор ТМБ после первого вскрытия флакона можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с при-

менением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.8. Подготовка стоп-реагента.

Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор смеси антигена и конъюгата		Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
	Конъюгат, мл	Антиген <i>T.gondii</i> , мл		ФСБ-Т концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл
1	1,0	0,1	1,0	2,0	До 50
2	2,0	0,2	2,0	4,0	До 100
3	3,0	0,3	3,0	6,0	До 150
4	4,0	0,4	4,0	8,0	До 200
5	5,0	0,5	5,0	10,0	До 250
6	6,0	0,6	6,0	12,0	До 300
7	7,0	0,7	7,0	14,0	До 350
8	8,0	0,8	8,0	16,0	До 400
9	9,0	0,9	9,0	18,0	До 450
10	10,0	1,0	10,0	20,0	До 500
11	11,0	1,1	11,0	22,0	До 550
12	12,0	1,2	12,0	24,0	До 600

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В одну лунку, например, А-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца (K⁺), в две лунки, например, В-1, С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K⁻).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п.7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37±1°С в течение 30 мин.

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 не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться 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 рабочего раствора смеси конъюгата и антигена *T.gondii*. (п.7.6).

Для внесения смеси конъюгата и антигена использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

8.4. Удалить содержимое лунок и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором так, как указано в п. 8.3.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.7).

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$.

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

8.7. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОПсрК⁻).

Среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОПсрК⁻) должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом (ОПК⁺) должно быть не менее 0,8 ед. опт. плотн.

Только в случае соблюдения указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности (ОП_{крит.}) по формуле:

$$ОП_{\text{крит.}} = ОП_{\text{ср. К}^-} + 0,3$$

где: ОП_{ср. К⁻} - среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, измеренное в двухволновом режиме 450/620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

9.3. Результат анализа считают положительным, если $ОП_{\text{обр}} \geq ОП_{\text{крит.}}$

Результат анализа считают отрицательным если $ОП_{\text{обр}} < ОП_{\text{крит.}}$

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор тетраметилбензидина; контрольные образцы; конъюгат и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

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

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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.

По вопросам, касающимся качества набора «Токсо-IgM-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, 227-75-40

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

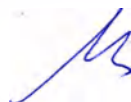
С.н.с. лаборатории маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

 Б.Г. Некрасов

Зав. лабораторией маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

 И.Н. Кувшинова

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

 М.Ю. Рукавишников

«Согласовано»

Зам. директора по научной
работе ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Руководитель лабораторного отдела ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

07 июня Кудрявцева Е.Н.
2017 г.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»



07 июня Масяго А.В.
2017 г.