

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii*.

(ВектоТоксо-IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоТоксо-IgM предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови человека.

1.2. Токсоплазмоз – широко распространенное инфекционное заболевание человека и животных, характеризующееся длительным хроническим течением, полиморфностью клинической картины (от бессимптомного носительства до летальных форм болезни) и возможностью внутриутробного инфицирования плода.

Возбудитель токсоплазмоза – *Toxoplasma gondii* – внутриклеточный паразит, размером 4–7 мкм.

1.3. Инфицированность населения колеблется от 10 до 90%.

В подавляющем большинстве случаев при токсоплазмозе наблюдается бессимптомное носительство паразита, сопровождающееся наличием специфических антител в крови.

В то же время возможны и клинически выраженные варианты течения первичной инфекции (как правило, возникающие у лиц с нарушением иммунитета) с развитием энцефалита, миокардита, миозита, увеита, формированием хронической инфекции.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.Н. Кувшиновой.

Весьма актуальна проблема генерализации латентного токсоплазмоза у ВИЧ-инфицированных с развитием тяжелого некротического энцефалита с большой вероятностью летального исхода.

Токсоплазмоз входит в группу TORCH-инфекций, считающихся потенциально опасными для внутриутробного развития плода. Только первичное заражение женщины во время беременности может привести к инфицированию плода. Таким образом, практически важным является вопрос о моменте инфицирования беременной: задолго до, непосредственно перед, либо во время беременности. Важное значение для интерпретации результатов имеет срок первого анализа на токсоплазмоз.

Наиболее тяжелое поражение плода обусловлено инфицированием в первые три месяца беременности – в период органогенеза.

При попадании токсоплазм в организм человека через 7–14 дней начинается первичный гуморальный иммунный ответ – продуцируются специфические IgM (Тохо-IgM). Максимальный уровень концентрации Тохо-IgM достигается к 20–30-му дню от момента инфицирования. Полное их исчезновение в большинстве случаев (около 70 %) происходит в течение 3–4 месяцев, однако, возможно присутствие Тохо-IgM и более длительное время – до 1 года и более (около 10 % случаев). Следовательно, обнаружение Тохо-IgM не является строгим показателем свежей инфекции, а свидетельствует только о первичном инфицировании в пределах предыдущих 12 месяцев жизни.

Поскольку IgM не проникают через плаценту, определение Тохо-IgM может помочь в диагностике при неонатальном и постнатальном мониторинге врожденного токсоплазмоза.

Реинфицирование токсоплазмами на фоне ранее приобретенного здорового носительства также может приводить к появлению Тохо-IgM. В настоящее время нет подтвержденных данных, что Тохо-IgM могут выявляться при реактивации латентной инфекции, хроническом токсоплазмозе.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 92 неизвестных образцов, 4 контрольных образцов (всего 96 определений при использовании всего планшета), допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgM к *Toxoplasma gondii* представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. Специфическими компонентами набора реагентов являются: антиген *Toxoplasma gondii*, иммобилизованный в лунках планшетов, конъюгат моноклональных ан-

тител к IgM человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованным антигеном *Toxoplasma gondii* происходит связывание специфических антител в анализируемом образце и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата моноклональных антител к IgM человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «антиген-антитело-конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к *Toxoplasma gondii* в анализируемом образце сыворотки.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок *Toxoplasma gondii*, 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 против IgM человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25), готовый для использования – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина (ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii* – соответствие результатов выявления набором IgM к *Toxoplasma gondii* требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-295), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические 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 иммуноглобулинов классов М к *Toxoplasma gondii* – соответствие результатов выявления набором IgM к *Toxoplasma gondii* требованиям стандартной панели предприятия (СППГ) (рег. № 05-2-82), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с сыворотками панели меньше величины критического значения оптической плотности ($ОП_{СПП}^{-} < ОП_{крит}$).

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 поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором 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.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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 по-

мещениях, 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.

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 при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 10 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 мкл до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 мес. Допускается од-

7.6. Приготовление раствора тетраметилбензидина

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию.

Необходимое количество раствора тетраметилбензидина (см. таблицу расхода реагентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента.

Раствор тетраметилбензидина можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор тетраметилбензидина, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл
1	1,0	1,0	2,0	До 50
2	2,0	2,0	4,0	До 100
3	3,0	3,0	6,0	До 150
4	4,0	4,0	8,0	До 200
5	5,0	5,0	10,0	До 250
6	6,0	6,0	12,0	До 300
7	7,0	7,0	14,0	До 350
8	8,0	8,0	16,0	До 400
9	9,0	9,0	18,0	До 450
10	10,0	10,0	20,0	До 500
11	11,0	11,0	22,0	До 550
12	12,0	12,0	24,0	До 600

7.8. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В любые две лунки внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в одну лунку – 100 мкл положительного контрольного образца (K^+). Во все остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и 10 мкл цельных исследуемых сывороток, тщательно перемешать, при этом цвет раствора должен измениться с фиолетового на синий. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 10 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

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

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть с помощью промывочного устройства, добавляя во все лунки по 400 мкл промывочного раствора (см п. 7.3) в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.5), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37 \pm 1$ °C.

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

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

7.12. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.10.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6), планшет заклеить пленкой и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °C.

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

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2. Среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,30 ед. опт. пл.

Значение ОП в лунке с K^+ должно быть не менее, чем 0,90 ед. опт. пл.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$).

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.} K^- + 0,3$$

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

Результат анализа считается отрицательным, если $ОП_{обр.} < ОП_{крит.}$

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в пределах 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 набора;

- положительный и отрицательный контрольные образцы, конъюгат можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор тетраметилбензидина, раствор для разведения сывороток 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 суток.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоТоксо-IgM» следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-73-46, 227-75-43, тел./факс (383) 336-60-30.

Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Н. Кувшинова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

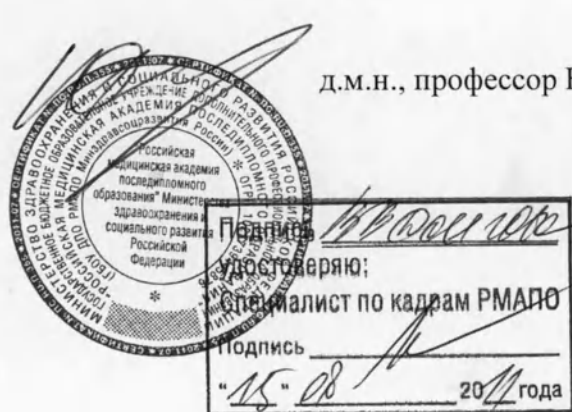
М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

«08» августа 20 11 г.

д.м.н., профессор В.В. Долгов



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 листов

