

ия верна

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 24.06.2008 № 959/06-2836

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.П. Хусаинов

«26» 2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови
(ВектоТоксо-IgA)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоТоксо-IgA (далее по тексту - набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* может быть использовано для уточнения сроков инфицирования, дифференцировки первичного токсоплазмоза от хронической и паст-инфекции.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 91 исследуемых образцов, 5 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

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

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета антигеном *T.gondii*. Имеющиеся в

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

сыворотке специфические антитела к *T.gondii* связываются с антигеном, формируя комплекс антиген-антитело.

На второй стадии связавшиеся специфические IgA взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgA человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляется цветной реакцией с субстратом пероксидазы – перекисью водорода и хромогеном – тетраметилбензидином.

Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных в комплекс IgA к *T.gondii*.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*; инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgA человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для промывания (РП), концентрат – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РПК) – 1 флакон (12 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* по стандартной панели сывороток, не содержащих IgA к *Toxoplasma gondii* СПП (рег. № 05-2-193), % - 100.

3.2. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* по стандартной панели сывороток, содержащих IgA к *Toxoplasma gondii* СПП (рег. № 05-2-193), % - 100.

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 образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных и бактериальных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °C;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным

объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);

- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) в течение 3 мес.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин 10 мин при комнатной температуре.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 мес.

7.3. Приготовление рабочего раствора для промывания планшет.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата раствора для промывания и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий раствор для промывания планшет можно хранить при температуре 2-8 °С не более 3 суток.

7.4. Подготовка контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

После отбора части содержимого контрольные образцы можно хранить при температуре 2-8° С в течение 1 мес.

7.5. Подготовка исследуемых сывороток

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При этом темно-красный цвет должен измениться на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, данную сыворотку анализировать не рекомендуется.

Разведенные сыворотки хранить не более 3 ч.

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий раствор для промывания	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Тетраметил бензидин, концентрат, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	Раствор для промывания, концентрат, мл	Дистилли- рованная вода, мл
1	0,1	1,0	70	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	700	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	770	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	840	12,0	24,0	до 600

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Внести во флакон необходимое количество раствора для разведения конъюгата и добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых

63
стрипов.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Внести во флакон необходимое количество СБР и добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный раствор должен быть прозрачным и бесцветным.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре (18-25 °C) не более 3 ч.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток.

В зависимости от числа используемых стрипов, для внесения контрольных образцов рекомендуется следующая схема:

- при использовании 1 стрипа - в одну лунку 100 мкл K^+ и в две лунки по 100 мкл K^- ;
- при использовании 2 стрипов - в одну лунку 100 мкл K^+ и в три лунки по 100 мкл K^- ;
- при использовании 3 и более стрипов - в две лунки по 100 мкл K^+ и в три лунки по 100 мкл K^- .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки крови.

Лунки закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °C.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть с помощью промывающего устройства, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см. п. 7.3). 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 планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6.). Заклеить лунки пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °C.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.12. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как описано в п. 7.10.

64

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.7.) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при комнатной температуре (18 - 25 °С).

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

7.14. 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 нм – 650 нм; или 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

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}K^- + 0,3$$

где: $ОП_{ср}K^-$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.3. Среднее значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,90 ед. опт. плотн.

9.4. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,35 ед. опт. плотн.

9.5. Только при соблюдении положений п.п. 9.3 и 9.4 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.6. Положительными считать пробы с оптической плотностью равной или превышающей критическое значение: $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$.

9.7. Отрицательными считать пробы с оптической плотностью меньшей критического значения: $ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

где $ОП_{обр}$ - оптическая плотность исследуемого образца.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 1 мес. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С в течение 1 мес;

- концентрат раствора для промывания, субстратный буферный раствор, концентрат тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности;

- контрольные образцы, концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2-8 °С в течение 1 мес;

- рабочий раствор для промывания можно хранить при температуре 2-8 °С не более 3 суток;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (18-25°С) не более 3 ч;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч.

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95; 120-60-96.

Зав. лабораторией НИИСД
ЗАО «Вектор-Бест»

Директор ФГУ Н. ОНИИ ПИ

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Н. Кувшинова

А.А. Матущенко

М.Д. Хусаинов

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Набор должен храниться в герметичной упаковке в упаковке производителя при температуре 2-8 °C в течение всего срока годности (12 мес). Хранение компонентов набора не допускается.

10.2. Для длительного хранения набора может быть использована упаковка в течение 1 мес. В течение этого периода хранения набора.

10.3. Для длительного хранения набора можно хранить в упаковке производителя при температуре 2-8 °C в течение 1 мес.

10.4. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.5. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.6. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.7. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.8. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.9. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.10. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.11. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.12. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.13. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.14. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.

10.15. Компоненты набора для длительного хранения должны быть защищены от влаги и света. Упаковка должна быть герметичной. Упаковка должна быть защищена от влаги и света.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
Сергей листов

А

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* в сыворотке
(плазме) крови
(ВектоТоксо-IgA)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоТоксо-IgA предназначен для выявления иммуноглобулинов класса А (IgA) к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

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.

Инфицированность населения колеблется от 10 до 90%.

Токсоплазмоз представляет собой важную медико-социальную проблему, поскольку может формировать тяжелую патологию у детей и взрослых, особенно у иммунодефицитных лиц. Наибольшую опасность это заболевание представляет для беременных женщин, у кото-

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

рых в результате первичной инфекции может произойти самопроизвольный выкидыш либо родиться ребенок с тяжелыми пороками развития. Вследствие этого важной задачей для врача является определение сроков инфицирования беременной. Кроме того, определение стадии заболевания (острая фаза или хроническая инфекция) важно с точки зрения выбора тактики лечения. Согласно литературным данным, в 90% случаев IgA к *Toxoplasma gondii* (Тохо-IgA) сохраняются в течение 6 месяцев с момента инфицирования. Таким образом, определение Тохо-IgA является дополнительным маркером острого приобретенного токсоплазмоза. Поскольку IgA не проникают через плаценту, определение Тохо-IgA может помочь в диагностике врожденного токсоплазмоза при неонатальном и постнатальном мониторинге.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 96 неизвестных образцов, включая контроли, допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

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

На первой стадии анализа исследуемые образцы инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета антигеном *T. gondii*. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к *T. gondii* связываются с антигеном, формируя комплекс антиген-антитело. На второй стадии связавшиеся специфические IgA взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgA человека с пероксидазой хрена.

Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина (ТМБ). Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных в комплекс IgA к *T. gondii*.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

- слабоположительный контрольный образец ($K^+_{\text{слаб}}$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител против IgA человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);
- 25-кратный 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).

Набор дополнительно комплектуется:

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

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* – соответствие результатов выявления набором IgA к *Toxoplasma gondii* требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-193), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток крови, содержащие IgA к *Toxoplasma gondii* – составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* – соответствие результатов выявления набором IgA к *Toxoplasma gondii* требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-193), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток крови, не содержащие IgA к *Toxoplasma gondii* – составляет 100%.

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 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 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других 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.

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 °C;

– 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;

15

- 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 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

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

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды (см. таблицу расхода реагентов). При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

13

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная 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. Приготовление положительного, слабоположительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный, слабоположительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений.

После отбора части содержимого тщательно закупоренные флаконы хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, 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.

7.6. Приготовление конъюгата.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество конъюгата.

После отбора части содержимого тщательно закупоренный флакон хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.7. Приготовление раствора тетраметилбензидина

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора тетраметилбензидина.

После отбора части содержимого тщательно закупоренный флакон хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В любые две лунки внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в одну лунку – 100 мкл слабopоложительного контрольного образца ($K^+_{\text{слаб.}}$), в одну лунку – 100 мкл положительного контрольного образца (K^+). Во все остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (см. п. 7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

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

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

7.11. 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 (см. 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.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.6), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 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).

7.13. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшеты 5 раз, как указано в п. 7.11.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.7), инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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).

7.15. 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 5 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 0,35 ед. опт. пл.

Значение ОП в лунке с $K^{+}_{слаб.}$ должно быть не менее $ОП_{крит.}$.

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 ($ОП_{крит.}$).

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.} K^- + 0,3$$

где: $ОП_{ср.} K^-$ – среднее значение оптической плотности в лунке с отрицательным контрольным образцом.

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, слабоположительный 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 предварительного разведения сывороток, 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, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоТоксо-IgA» 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 маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Н Кувшинова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского
Клинического Института им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)



В.И. Шумский



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
девят листов

УТВЕРЖДЕНА

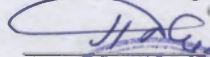
Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»


М.Д. Хусаинов
_____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii* в сыворотке
(плазме) крови
(ВектоТоксо-IgA)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоТоксо-IgA предназначен для выявления иммуноглобулинов класса А (IgA) к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

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.

Инфицированность населения колеблется от 10 до 90%.

Токсоплазмоз представляет собой важную медико-социальную проблему, поскольку может формировать тяжелую патологию у детей и взрослых, особенно у иммунодефицитных лиц. Наибольшую опасность это заболевание представляет для беременных женщин, у кото-

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

10

160

рых в результате первичной инфекции может произойти самопроизвольный выкидыш либо родиться ребенок с тяжелыми пороками развития. Вследствие этого важной задачей для врача является определение сроков инфицирования беременной. Кроме того, определение стадии заболевания (острая фаза или хроническая инфекция) важно с точки зрения выбора тактики лечения. Согласно литературным данным, в 90% случаев IgA к *Toxoplasma gondii* (Тохо-IgA) сохраняются в течение 6 месяцев с момента инфицирования. Таким образом, определение Тохо-IgA является дополнительным маркером острого приобретенного токсоплазмоза. Поскольку IgA не проникают через плаценту, определение Тохо-IgA может помочь в диагностике врожденного токсоплазмоза при неонатальном и постнатальном мониторинге.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 96 неизвестных образцов, включая контроли, допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

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

На первой стадии анализа исследуемые образцы инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета антигеном *T. gondii*. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к *T. gondii* связываются с антигеном, формируя комплекс антиген–антитело. На второй стадии связавшиеся специфические IgA взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgA человека с пероксидазой хрена.

Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина (ТМБ). Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных в комплекс IgA к *T. gondii*.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– слабоположительный контрольный образец (K^+ _{слаб}) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgA к *Toxoplasma gondii*, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);

– конъюгат моноклональных антител против IgA человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);

– раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);

– 25-кратный 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).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночками для реагента – 2 шт.;

– наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii*

– соответствие результатов выявления набором IgA к *Toxoplasma gondii* требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-193), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток крови, содержащие IgA к *Toxoplasma gondii* – составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса А к *Toxoplasma gondii*

– соответствие результатов выявления набором IgA к *Toxoplasma gondii* требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-193), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток крови, не содержащие IgA к *Toxoplasma gondii* – составляет 100%.

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 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 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других 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.

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;

16;

- 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 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ 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.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды (см. таблицу расхода реагентов). При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °C до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная 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. Приготовление положительного, слабоположительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный, слабоположительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений.

После отбора части содержимого тщательно закупоренные флаконы хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, 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.

7.6. Приготовление конъюгата.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество конъюгата.

После отбора части содержимого тщательно закупоренный флакон хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Приготовление раствора тетраметилбензидина

169

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора тетраметилбензидина.

После отбора части содержимого тщательно укупоренный флакон хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В любые две лунки внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в одну лунку – 100 мкл слабоположительного контрольного образца ($K^+_{\text{слаб.}}$), в одну лунку – 100 мкл положительного контрольного образца (K^+). Во все остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (см. п. 7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

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

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

7.11. 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 (см. 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.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.6), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 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).

7.13. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как указано в п. 7.11.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.7), инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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).

7.15. 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 5 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 0,35 ед. опт. пл.

Значение ОП в лунке с $K^{+ \text{ слаб.}}$ должно быть не менее $ОП_{крит.}$.

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 ($ОП_{крит.}$).

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.} K^- + 0,3$$

где: $ОП_{ср.} K^-$ – среднее значение оптической плотности в лунке с отрицательным контрольным образцом.

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, слабоположительный 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 тетраметилбензидаина, раствор для предварительного разведения сывороток, 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, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

16

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоТоксо-IgA» 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 маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Н Кувшинова

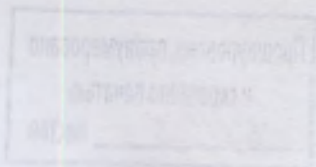
Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Начальник управления по науке,
инновациям и информатизации
ГБОУ ВПО НГМУ
Минздравсоцразвития России



М.Ф. Осипенко





Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью
десять листов

[Handwritten signature]