

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

В.П. Овчинников

" 31 "

№ 01-17-42-02



ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «Токсо-IgG-антитела» ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА G К *Toxoplasma gondii*

1. Назначение

Количественное и качественное определение антител класса G к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови у лиц с подозрением на токсоплазмоз, а также у беременных женщин, и при проведении сероэпидемиологических исследований.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Принцип действия набора реагентов основан на непрямом иммуноферментном анализе. Анализ на твердой фазе проводят в две стадии. На первой стадии исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным лизатным антигеном *Toxoplasma gondii*. Если в сыворотке (плазме) содержатся антитела к *Toxoplasma gondii*, образуется комплекс антиген-антитело. После промывки планшета в лунки планшета вносят антивидовой конъюгат (моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена), который связывается с антителами класса G к *Toxoplasma gondii*, если они присутствуют в образце. Визуализация образовавшегося комплекса «антиген-антитело-конъюгат» происходит за счет ферментативной реакции пероксидазы с субстратной смесью и образования окрашенного продукта. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты (стоп-реагент) результаты анализа учитывают фотометрически. Величина оптической плотности (ОП) окрашенной хромогенной смеси пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы.

2.2 Состав набора

Иммуносорбент – лизатный антиген *Toxoplasma gondii*, сорбированный в лунках разборных полистироловых 96-луночных планшетов - 1 шт.

A,B,C,D,E – калибровочные положительные образцы - сыворотки крови человека, содержащие иммуноглобулины класса G к токсоплазме в концентрациях 300 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 75 МЕ/мл, 50 МЕ/мл и 25 МЕ/мл соответственно, и не содержащие антиген ВИЧ, HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2 и к вирусу гепатита С (ВГС), инаktivированные прогреванием при температуре 56 °C в течение 3 ч; прозрачные красного цвета жидкости – по 1,0 мл - 5 фл..

К- - контрольный отрицательный образец - сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса G к токсоплазме, антитела к ВИЧ 1,2 и к ВГС, антиген ВИЧ и HBsAg; инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 3 ч; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость - 1,5 мл - 1 фл..

Кг - конъюгат - моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная синего цвета жидкость - 0,3 мл - 1 фл..

РПР-С - раствор для предварительного разведения сывороток, прозрачная коричневого или светло-коричневого цвета жидкость - 13,0 мл - 1 фл..

РБР-С - буферный раствор для разведения сывороток, прозрачная синего цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном встряхивании - 11,0 мл - 1 фл..

РБР-К - буферный раствор для разведения конъюгата, прозрачная зеленого цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном встряхивании - 13 мл - 1 фл..

ФСБ-Т(концентрат x25) - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость. Допускается выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании при температуре 37 °С в течение 30 мин - 26,0 мл - 1 фл..

БРС - буферный раствор для субстрата, прозрачная бесцветная жидкость - 13,0 мл - 1 фл..

ТМБ - хромоген, 3,3',5,5' - тетраметилбензидин, прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость: 0,7 мл - 1 фл..

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость - 6 мл - 1 фл..

Реагенты набора упакованы в картонную пачку, в которую вкладывают настоящую инструкцию.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Оптическая плотность калибровочных положительных образцов А от 2,2 до 3,6, В от 1,1 до 2,4, С от 0,6 до 1,3, D от 0,35 до 0,8, Е от 0,25 до 0,4 и концентрация иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii* в калибровочных положительных образцах 300 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 75 МЕ/мл, 50 МЕ/мл и 25 МЕ/мл соответственно.

Набор реагентов «Токсо-IgG-антитела» рассчитан на 96 определений, включая контрольные образцы. Диапазон измеряемых концентраций 25 – 300 МЕ/мл.

4. Меры предосторожности

Предупреждение! Набор реагентов «Токсо-IgG-антитела» является полностью биологически безопасным, вместе с тем при проведении исследований необходимо соблюдать правила работы с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках, спецодежде;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке раствором спирта этилового с объемной долей 70 % или раствором водорода перекиси с массовой долей 6 % с последующей выдержкой не менее 2 ч при температуре от 20 до 25 °С.

5. Оборудование и материалы

- фотометр;
- термостат;
- таймер;
- холодильник бытовой;
- вошер;
- пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные, диапазоны

измерений 0,5 – 10 мкл, 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 100 - 1000 мкл с погрешностью измерения не более указанной в паспорте на данное оборудование;

- перчатки медицинские хирургические;
- 6 % -ный раствор перекиси водорода;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндры мерные вместимостью 0,5; 1,0 л;
- вода дистиллированная.

6. Анализируемые образцы

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 20 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более 3 мес.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность контаминации посторонней микрофлорой.

При необходимости осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 10-15 мин при 3000 об /мин.

Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией, не использовать термоинактивированные сыворотки и сыворотки с добавлением азида натрия. Избегать повторных циклов замораживания и оттаивания образцов. Для возможного повторного исследования образца сыворотки желательно образец разделить на аликвоты, которые хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более трех мес.

Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки с погрешностью измерения объема не более 5 %.

7. Проведение анализа

Внимание! При проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.

Окисляющие агенты, ионы металлов, моющие средства на посуде могут разлагать ТМБ. Во избежание ложных результатов необходимо тщательно отмывать посуду раствором кислоты серной или соляной 1 моль/л с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Перед постановкой реакции все компоненты тест-системы необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.1 Приготовление реагентов, растворов, исследуемых образцов сывороток

7.1.1 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

При наличии во флаконе с ФСБ-Т(концентрат x25) визуально определяемого осадка солей флакон с концентратом выдерживать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т(концентрат x25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в мерный цилиндр внести концентрат ФСБ-Т из флакона и добавить дистиллированную воду в соответствии с таблицей.

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т (концентрат х25) хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора, рабочий раствор ФСБ-Т – при температуре от 2 до 8 °С в течение двух недель.

Расход реагентов набора «Токсо-IgG-антитела»

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т												
ФСБ-Т (концентрат х25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
Вода дистиллированная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650
Приготовление рабочего раствора конъюгата												
РБР-К, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Конъюгат, мл	х*	2х	3х	4х	5х	6х	7х	8х	9х	10х	11х	13х
Приготовление рабочего раствора хромогена												
БРС, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ, мл	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400	0,450	0,500	0,550	0,650

* х - объем конъюгата - подбирается для каждой серии на производстве тест-систем при изготовлении наборов и указывается в инструкции по применению, вложенной в набор.

7.1.2 Подготовка РБР-С, РПР-С, РБР-К и БРС

РБР-С, РПР-С, РБР-К, БРС – готовы к использованию.

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

Хранение: после вскрытия флакона раствор хранить в закрытом виде при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.3 Подготовка калибровочных положительных образцов и контрольного отрицательного образца

А, В, С, D, Е и К- готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона образцы хранить при температуре от 20 до 25 °С до 48 ч, при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата подбирается для каждой серии тест-системы.

При постановке ИФА на полном планшете из флакона с Кг отобрать объем конъюгата, указанный в таблице для полного планшета (12 стрипов) и перенести его во флакон с РБР-К.

При постановке ИФА на одном или нескольких стрипах разборного планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем РБР-К и добавить соответствующий объем конъюгата, исходя из приведенной выше таблицы. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Хранение: рабочий раствор конъюгата хранить при температуре от 20 до 25 °С до 15 мин. При использовании нескольких стрипов планшета остаток конъюгата хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.5 Приготовление рабочего раствора хромогена

ТМБ используется в рабочем разведении 1:20.

При постановке ИФА на полном планшете из флакона с ТМБ отобрать 650 мкл раствора и перенести его во флакон с БРС, тщательно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем БРС и добавить соответствующий объем ТМБ (см. таблицу).

Хранение: рабочий раствор хромогена хранить при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте до 20 мин, остаток ТМБ хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

Внимание! Отбирать концентрат ТМБ только новыми наконечниками для пипеток.

7.1.6 Приготовление стоп-реактанта

Стоп-реактент готов к использованию.

Срок хранения 1,5 года при температуре от 2 до 8° С.

7.1.7 Использование планшета с иммобилизованным лизатным антигеном

Перед вскрытием пакет с планшетом необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 20 до 25 °С. При использовании нескольких стрипов оставшиеся стрипы планшета хранить в герметично закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.8 Подготовка исследуемых образцов сывороток

Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПР-С). Для этого в лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл РПР-С и по 10 мкл исследуемых сывороток, тщательно перемешать. Цвет раствора после добавления сывороток должен измениться.

Хранение: не более 3 ч при температуре от 20 до 25 °С.

7.2 Проведение иммуноферментного анализа

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.1 В лунки А,В,С,Д,Е первого и второго рядов планшета внести калибровочные положительные образцы А(300МЕ/мл), В(150МЕ/мл), С(75МЕ/мл), Д(50МЕ/мл), Е(25МЕ/мл) по 100 мкл, в лунки F,G этих же рядов внести по 100 мкл контрольного отрицательного образца К-, в лунку Н внести 100 мкл РБР-С для контроля конъюгата. В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток, предварительно разведенных в 10 раз на дополнительном планшете. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз. После этого планшет закрыть крышечкой или клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.2 По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором (6 %-ный раствор перекиси водорода). Планшет с иммобилизованным антигеном промыть пять раз рабочим раствором ФСБ-Т с помощью автоматического промывателя или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 250 мкл раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, активно постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге. Фильтровальную бумагу желательно использовать однократно. Процесс отмывки лунок планшета проводить под постоянным визуальным контролем.

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.3 После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. приготовление п.7.1.4). Планшет закрыть и выдержать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.4 По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз и удалить остатки влаги из планшета (см. п.7.2.2).

ТРЕТЬЯ (ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.5 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора хромогена (см. приготовление п.7.1.5). Планшет поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре 37 °С.

Во избежание ложных результатов при раскатывании рабочего раствора хромогена:

а) не касайтесь стенок лунок планшета наконечниками;

б) избегайте образования аэрозолей и попадания субстратной смеси на внутренний фильтр пипетки.

7.2.6 Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реактанта.

Внимание! Следует избегать попадания стоп-реактанта на открытые участки тела и одежду. При попадании - промыть большим количеством воды!

Схема проведения анализа

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Лунки планшета, покрытые антигеном, специфичным к *Toxoplasma gondii*

↓
Внести:

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ 2x100 мкл А,В,С,D,E - калибровочных положительных образцов
4x100 мкл К - контрольного отрицательного образца,
2x100 мкл РБР-С

по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл предварительно разведенных образцов сывороток

↓
Инкубировать 30 мин, при 37 °С

↓
Промыть:

рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 250 мкл в каждую лунку), 5 раз

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

↓
Внести:

по 100 мкл рабочего раствора конъюгата

↓
Инкубировать 30 мин, при 37 °С

↓
Промыть:

рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 250 мкл в каждую лунку), 5 раз

ТРЕТЬЯ

↓
Внести:

(ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ по 100 мкл рабочего раствора хромогена

РЕАКЦИИ

↓
Инкубировать 15 мин при 37 °С в защищенном от света месте

↓
Внести:

по 50 мкл стоп-реактанта

↓
Измерять при 450 нм

8. Регистрация результатов анализа

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху.

9. Учет и оценка результатов

Результаты учитывают только в том случае, если среднее значение ОП в лунках с контролем конъюгата ОПКг не превышают 0,15, в лунках с К- среднее значение ОПК-(ср.) не более 0,2, в лунках с калибровочными положительными образцами среднее значение ОП образца А находится в пределах от 2,2 до 3,6, среднее значение ОП образца В - от 1,1 до 2,4, среднее значение ОП образца С - от 0,6 до 1,3, среднее значение ОП образца D - от 0,35 до 0,8, среднее значение ОП образца Е - от 0,25 до 0,4 и среднее значение оптической плотности калибровочных положительных образцов находится в прямой пропорциональной зависимости от их концентрации, выраженной в МЕ/мл, среднее значение ОП калибровочного положительного образца Е должно быть не ниже ОПкрит.

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

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

В случае количественного варианта анализа для определения концентрации антител класса G к токсоплазме в анализируемых образцах необходимо построить калибровочный график: на оси ординат отложить оптические плотности стандартных образцов, на оси абсцисс соответствующие значения концентраций (МЕ/мл), построить калибровочную кривую. Для определения концентрации Токсо-IgG в анализируемых пробах на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. Полученное значение на оси абсцисс будет соответствовать концентрации Токсо-IgG в исследуемом образце в МЕ/мл. Если уровень Токсо-IgG в анализируемом образце менее 25 МЕ/мл, результат оценивается как отрицательный. Если уровень Токсо-IgG в анализируемом образце находится в интервале от 25 до 50 МЕ/мл, результат промежуточный – уровень антител не обеспечивает иммунитет к токсоплазме. Исследуемый образец считается положительным, если концентрация Токсо-IgG в нем находится в интервале от 50 до 75 МЕ/мл. Исследуемый образец считается высокоположительным, если концентрация Токсо-IgG более 100 МЕ/мл.

При качественной оценке результатов анализа исследуемая сыворотка считается слабоположительной, если ее оптическая плотность находится между значениями оптических плотностей, соответствующих калибровочным образцам Е и D, исследуемая сыворотка считается высокоположительной, если ее ОП больше, чем ОП образца С. Исследуемая сыворотка считается отрицательной, если ее ОП ниже ОП образца Е.

10. Срок годности

Срок годности набора реагентов 12 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит

11. Условия хранения и транспортирования набора

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Транспортирование наборов должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 5 дней. Замораживание не допускается

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

По вопросам, касающимся качества набора «Токсо-IgG-антитела», следует обращаться в ООО «ИмДи-спектр» по адресу:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, п. Кольцово, д.2а;
тел/факс (383) 336-76-23;
в ИМПитМ им. Е.И. Марциновского ММА им. И.М. Сеченова по адресу:
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 20;
тел. (495) 246-67-64

Директор ООО «ИмДи-спектр»



Н.А.Кривенчук

" " 200__ г.

Руководитель медицинских исследований
Зав. лабораторией иммунологии
ИМПитМ им. Е.И. Марциновского
ММА им. И.М. Сеченова

О.Г. Полетаева
" " 200__ г.

О.Г. Полетаева

200__ г.