



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА М к *Toxoplasma gondii*

«ИмДи-Токсо-IgM»

1. Назначение.

Набор реагентов «ИмДи-Токсо-IgM» предназначен для выявления антител класса М к *Toxoplasma gondii* методом «захвата» в сыворотке (плазме) крови человека посредством твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы, или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

Выявление антител класса М к *Toxoplasma gondii* может быть использовано при обследовании лиц с подозрением на токсоплазмоз, при обследовании беременных женщин, при проведении сероэпидемиологических исследований.

2. Характеристика набора.

2.1 Принцип действия.

Выявление антител класса М к *Toxoplasma gondii* производится методом «захвата».

При наличии в исследуемом образце антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* антитела против IgM человека, сорбированные на поверхности лунок полимерного планшета, связываются с IgM антителами сыворотки крови. Конъюгат – антиген *Toxoplasma gondii*, меченный пероксидазой хрена, связывается с IgM – антителами, специфическими к *Toxoplasma gondii*. Таким образом, антитела к *Toxoplasma gondii* выявляются с помощью специфического конъюгата. Присутствие в сыворотке специфических IgG-антител, ревматоидного фактора и антинуклеарных антител потенциально не оказывает влияния на результаты реакции. Образовавшийся комплекс «антитело-антитело-конъюгат» выявляется по реакции с субстратом пероксидазы-тетраметилбензидином, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется с помощью спектрофотометра.

2.2 Состав набора.

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами против IgM человека - (иммуносорбент) - 1 шт.;
- контрольный положительный образец - раствор иммуноглобулинов класса IgM человека, сшитых с моноклональными антителами, специфичными к пероксидазе хрена, - (K+) - прозрачная красного цвета жидкость - 1 флакон (1,3 мл);
- контрольный отрицательный образец на основе сыворотки крови человека, не содержащий IgM к *Toxoplasma gondii* (K-) - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость - 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат рекомбинантного антигена *Toxoplasma gondii* с пероксидазой хрена (Kг) - прозрачная зеленого цвета жидкость - 1 флакон (0,35 мл);
- буферный раствор для разведения сывороток (РБР-С) - прозрачная синего цвета жидкость - 1 флакон (11 мл);

- буферный раствор для разведения конъюгата (РБР-К) - прозрачная зеленого цвета жидкость - 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т(концентрат x25)) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость. Допускается выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании при температуре 37 °С в течение 30 минут - 1 флакон (26 мл);
- буферный раствор для субстрата (БРС) - прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ) - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость - 1 флакон (0,7 мл);
- стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон (6 мл);
- пленка для заклеивания планшета - 2 шт.;
- ванночка для реагентов - 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4-200 мкл - 16 шт.

3. Аналитические и диагностические характеристики.

Набор реагентов «ИмДи-Токсо-IgM» предназначен для скрининговых исследований и первичного обследования пациентов. Набор реагентов выявляет специфические иммуноглобулины класса М к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови человека.

Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к *Toxoplasma gondii* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Аналитическая чувствительность. При титровании не менее чем до 1:160 образец №3 или аналогичный по содержанию IgM к *Toxoplasma gondii* (СПП (рег. № СОП-06-11)) должен показывать положительный результат.

Воспроизводимость. Воспроизводимость исследовали, определяя коэффициент вариации (КВ).

Коэффициент вариации для трех образцов сывороток с разным уровнем IgM к *Toxoplasma gondii* с использованием набора «ИмДи-Токсо-IgM» не превышает 8 %. Величину КВ определяли при 11 параллельных измерениях каждого образца сыворотки.

Сыворотка	Индекс позитивности (ИП)	КВ, %	Количество измерений
1	9,0	1,6	11
2	4,1	2,9	11
3	2,6	3,0	11

Коэффициент вариации в разных опытах для трех образцов сывороток с разным уровнем IgM к *Toxoplasma gondii* с использованием двух серий набора «ИмДи-Токсо-IgM» не превышает 8 %.

Величину КВ определяли при трех параллельных измерениях каждой сыворотки в течение трех дней на двух сериях набора реагентов.

Сыворотка	Индекс позитивности (ИП)	КВ, %	Количество измерений
1	8,8	4,6	18
2	4,0	5,1	18
3	2,6	6,2	18

4. Меры предосторожности

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000, Приказ Минздрава РФ от 6 июня 2012 г. № 4н).

4.2 Все компоненты набора, за исключением стоп-реактанта, являются нетоксичными. Стоп-реактант обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты 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 января 1991 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 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;
- прибор, позволяющий производить инкубирование при температуре 37 ± 1 °C (термостат);
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- перчатки хирургические резиновые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. Анализируемые образцы

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 40 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2 - 8 °C не более 7 сут, либо при минус 20 °C 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 2 - 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более 3 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.

7. Проведение анализа

7.1 Подготовка к анализу

7.1.1 Извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре 18-25 °С не менее 30 мин.

7.1.2 Подготовка планшета.

Вынуть из пакета и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в герметично закрытом пакете при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности.

7.1.3 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

Содержимое флакона с ФСБ-Т (концентрат x25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе ФСБ-Т(концентрат x25) осадка солей, флакон выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

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 x25) хранить при температуре 2 - 8 °С в течение срока годности набора, рабочий раствор ФСБ-Т – при температуре 2 - 8 °С не более 5 сут.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата подбирается для каждой серии тест-системы.

При постановке ИФА на полном планшете (12 стрипов) или одном или нескольких стрипах разборного планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем РБР-К и добавить соответствующий объем конъюгата, исходя из приведенной ниже таблицы. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

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

7.1.5 Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

При постановке ИФА на полном планшете (12 стрипов) 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 20 - 25 °С в защищенном от света месте не более 20 мин, остаток ТМБ хранить при температуре 2 - 8 °С в течение срока годности набора.

Внимание! Отбирать концентрат ТМБ только новыми наконечниками для пипеток.

Расход реагентов набора «ИмДи-Токсо-IgM»

	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 дис- тиллиро- ванная, 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 тетраметилбензидина												
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.

7.1.6 Приготовление контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию.

Хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.1.7 Приготовление РБР-С, РБР-К, стоп-реагента

РБР-С, РБР-К, стоп-реагент – готовы к использованию.

После вскрытия флакона хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.2 Проведение иммуноферментного анализа.

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ.

7.2.1 В лунку А1 планшета внести 100 мкл К⁺ - контрольного положительного образца, в лунки В1 и С1 внести по 100 мкл К⁻ - контрольного отрицательного образца. В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 10 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 10 мин.

После этого планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Внимание! Пленка предназначена для одноразового использования!

7.2.2. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором (6 %-ный раствор перекиси водорода). Планшет с иммобилизованным антигеном промыть 5 раз рабочим раствором ФСБ-Т с помощью промывателя или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 300 мкл раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.3. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. приготовление п.7.1.4). Планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

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

7.2.4 По окончании второй инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т 5 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 тетраметилбензидина (см. приготовление п.7.1.5). Планшет поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

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

Во избежание ложных результатов при распылении рабочего раствора тетраметилбензидина:

- 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-реагента.

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

Схема проведения анализа

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами против IgM человека



Внести:

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ 1x100 мкл K+, 2x100 мкл K-,
по 90 мкл РБР-С, по 10 мкл образцов сывороток



Инкубировать 30 мин, $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$



Промыть:

Рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 300 мкл в каждую лунку), 5 раз



ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

Внести:

по 100 мкл рабочего раствора конъюгата



Инкубировать 30 мин, $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$



Промыть:

рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 300 мкл в каждую лунку), 5 раз



ТРЕТЬЯ
(ФЕРМЕНТАТИВНАЯ)
СТАДИЯ РЕАКЦИИ

Внести:

по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина



Инкубировать 15 мин при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте



Внести:

по 50 мкл стоп-реагента



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. Измерение проводят сразу или в течение 15 мин после остановки реакции.

9. Учет и оценка результатов

Результаты учитывают только в том случае, если:

- среднее значение оптической плотности в лунках с K^- ОПК⁻ (ср.) не более 0,2,
- значение оптической плотности в лунке с K^+ ОПК⁺ не менее 1,0.

В противном случае исследование необходимо повторить.

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

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОПК}^-(\text{ср.}) + 0,2$$

Для каждого исследуемого образца сыворотки рассчитать индекс позитивности (ИП):

$$\text{ИП} = \frac{\text{ОП}_{\text{обр.}}}{\text{ОП}_{\text{крит.}}} \quad (2),$$

Положительным считают образец со значением ИП, превышающим 1,1 (ИП > 1,1).

Отрицательным считают образец со значением ИП менее 0,9 (ИП < 0,9).

Образец считают сомнительным, если индекс позитивности (ИП) исследуемого образца сыворотки находится в интервале от 0,9 до 1,1 ($0,9 \leq \text{ИП} \leq 1,1$). Такую сыворотку рекомендуется исследовать повторно. Если результат будет опять сомнительным, следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2-4 недели. В случае повторного получения сомнительного результата такой образец считать отрицательным.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

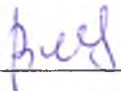
Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С. Замораживание не допускается.

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

Транспортирование производить при температуре 2 - 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

По вопросам, касающимся качества набора «ИмДи-Токсо-IgM»,
следует обращаться в ООО «ИмДи-спектр» по адресу:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, п. Кольцово, д.2а;
тел/факс (383) 336-76-23

Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»

 В.Г. Майданюк
«24» апреля 20 14 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России

 Д.М.В. профессор В.В. Долгоб
«7» мая 20 14 г.

Пронумеровано,
прошнуровано и опечатано
7 листов

Директор
ООО «ИмДи-спектр»
«25» _____ 20 _____ г.

