«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 20 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii*

(ВектоТоксо-IgG-авидность)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii* «ВектоТоксо-IgG-авидность» (далее по тексту – набор) предназначен для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на трехстадийном «непрямом» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках параллельных рядов с иммобилизованным антигеном *Toxoplasma gondii* (далее по тексту – антиген). Содержащиеся в исследуемых образцах специфические антитела (в том числе IgG) связываются с антигеном, формируя комплекс «антиген–антитело». На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплекса «антиген–антитело», включающий IgG с более низкими константами связывания (низкой авидностью). На третьей стадии конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена взаимодействует с комплексами «антиген–IgG». При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген–IgG–конъюгат». Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к *Toxoplasma gondii* в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

Индекс авидности рассчитывается как отношение оптической плотности, полученной в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лунках в присутствии диссоциирующего агента, к оптической плотности, полученной при анализе без диссоциирующего агента, и выражается в %.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание.*	**Кол-во**
Планшет разборный с иммобилизованным антигеном *Toxoplasma gondii*	1 шт.
Контрольный образец высокоавидный (КВ) *Содержит высокоавидные IgG к Toxoplasma gondii.* *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 1,7 мл
Контрольный образец низкоавидный (КН) *Содержит низкоавидные IgG к Toxoplasma gondii.* *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 1,7 мл
Контрольный образец пороговый (КП)* *Содержит IgG к Toxoplasma gondii.* в концентрации 10 МЕ/мл *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 1,7 мл
Конъюгат *Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.* *Содержит натрия мертиолят (0,0008 %); ProClin 150 (0,0039 %); ProClin 300 (0,027 %); фенол (0,004 %).*	1 фл., 13,0 мл
Белок-диссоциирующий агент (БДА) *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 6,0 мл
Раствор сравнения (РС) *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 8,0 мл
Раствор для разведения сывороток (РРС) *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 12,0 мл
Раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) *Содержит ProClin 300 (0,02 %).*	1 фл., 10,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25 %).*	2 фл., по 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) *Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,025 %).*	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9 %).*	1 фл., 12,0 мл
Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
Плёнки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

* Контрольный образец пороговый аттестован относительно «WHO International Standard 4th IS for Antibodies, Human, to Toxoplasma gondii» (NIBSC code: 13/132)

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность выявления низкоавидных иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii*: клинические испытания, проведенные на 144 низкоавидных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 69 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 95,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.2. Диагностическая специфичность выявления высокоавидных иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii*: клинические испытания, проведенные на 171 высокоавидных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 96 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 96,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, натрия мертиолят, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2 «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными 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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С или термостатируемый шейкер

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

орбитального типа, поддерживающий температуру (37±1) °С, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 10 до 5000 мкл;

– дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека или образцы плазмы крови, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина, ЭДТА.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки или плазмы крови, содержащие взвешенные частицы, необхо-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

димо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

− Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 мин.

– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-регента при температуре (2-30) °С.

– Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

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

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– Для приготовления растворов и проведения ИФА использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% этиловом спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих 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 (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванноч-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом, а затем дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

– Запрещается повторное использование планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей необходимо прогреть его при температуре (30–40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Тх25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2 -8) ºС не более 1 месяца или при (18 – 26) ºС не более 7 дней.

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Раствор ТМБ.

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

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

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

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

10-ти кратно разведенные образцы можно хранить не более 3 ч при температуре (18-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

26)°С.

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25 мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Контрольные образцы (КВ, КН, КП), стоп-реагент, РС и БДА готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В лунки стрипов внести попарно по 100 мкл контрольных образцов для прямого (нечетные стрипы) и диссоциирующего (четные стрипы) ИФА. Например, в лунки А-1, А-2 внести КП; в лунки В-1, В-2 – КН, в лунки С-1, С-2 – КВ.

Во все остальные лунки внести по 90 мкл РРС, затем попарно в соседние лунки двух стрипов внести по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.6.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1) °С либо 15 мин в термостатируемом шейкере при температуре (37±1) °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 2 раза промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Во все лунки нечетных стрипов (для прямого ИФА) внести по 100 мкл РС. Во все лунки четных стрипов (для диссоциирующего ИФА) внести по 100 мкл БДА, кроме лунки А-2 с КП, в которую внести 100 мкл РС.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Стрипы инкубировать 15 мин при температуре (18-26) °С либо 2 мин в термостатируемом шейкере при температуре (37±1) °С, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин – при проведении первой инкубации в термостатируемом шейкере.

8.4. По окончании второй инкубации промыть лунки (как указано в п. 8.2.) 3 раза.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1) °С либо 15 мин в термостатируемом шейкере при температуре (37±1) °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин – при проведении предыдущих инкубаций в термостатируемом шейкере.

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

8.6. По окончании третьей инкубации промыть лунки (как указано в п. 8.2.) 5 раз.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (см п. 7.5.) и инкубировать 25 мин в защищённом от прямого солнечного света месте при температуре (18-26) °С либо 10 мин в термостатируемом шейкере при температуре (37±1) °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин – при проведении предыдущих инкубаций в термостатируемом шейкере.

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

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

8.9. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны - 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать индекс авидности (ИА) для контрольных образцов КВ и КН, используя значения ОП в прямом ИФА ($ОП_{прям.}$) и в диссоциирующем ИФА ($ОП_{дис}$), по формуле:

$$ИА = \frac{ОП_{дис}}{ОП_{прям.}} \times 100\%$$

9.2. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значения ОП в лунках с КП не менее 0,08 (ОП КП $\geq$ 0,08);
- значение индекса авидности КВ должно быть не менее 60% (ИА КВ $\geq$ 60%);
- значение индекса авидности КН должно быть не более 40% (ИА КН $\leq$ 40%).

9.3. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с контрольным образцом пороговым ($ОП_{ср}$.КП). Индекс авидности вычисляется только у образцов,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

содержащих IgG к *Toxoplasma gondii,* со значением ОП в прямом ИФА равным или превышающим $ОП_{ср.}$ КП.

9.4. Рассчитать индекс авидности (ИА) для исследуемых образцов, как указано в п. 9.1.

Значение ИА ≤ 40 % указывает на наличие низкоавидных IgG.

Значение ИА ≥ 60% указывает на наличие высокоавидных IgG.

Значение в интервале 40% < ИА< 60% – пограничный результат.

9.5. Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА находится в интервале:

$ОП_{ср.}КП \leq ОП_{обр} \leq ОП_{ср.}КП$ х 3, ошибка при определении индекса авидности может быть достаточно велика. Такие образцы необходимо исследовать в динамике. Мониторинг изменения индекса авидности IgG в парных образцах необходимо проводить в одной постановке ИФА.

9.6. Если значение ОП исследуемого образца в прямом ИФА выше 3,0, возможна ошибка в определении ИА, а именно, его завышение. С целью правильного определения индекса авидности в таких образцах необходимо повторить анализ с разведением образца в 400 раз (цельный образец следует сначала развести в 4 раза промывочным раствором (см. п. 7.3.), а затем - в соответствии с п.7.6). Если ОП разведенного образца остается более 3,0 о.е., то следует повторить исследование с большим разведением, например, в 1600 или в 3200 раз. Исключение составляют случаи, когда в образцах с $ОП_{прям}$ > 3,0 определены низкоавидные специфические IgG.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

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

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

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

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоТоксо-IgG-авидность», обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru