УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь

_____ В.Е.Шевчук
"08" 08 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G К TOXOPLASMA GONDII В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

«ИФА-Токсо-IgG»
Комплект 1

СОГЛАСОВАНО
Зам директора
РУП «Центр экспертиз и
испытаний в здравоохранении»
_____ С.И. Зинченко
"05" 08 2011 г.

СП ООО «Фармлэнд»
Генеральный директор

_____ В.В. Сенчук
"10" 08 2011 г.

2011

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

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для качественного и количественного определения содержания антител класса G к Toxoplasma gondii в сыворотке или плазме крови человека "in vitro" методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 планшет
Положительный контрольный образец (**К$^+$**)	1 флакон, 3,0 мл
Отрицательный контрольный образец (**К$^-$**)	1 флакон, 3,0 мл
Конъюгат (**Кг**)	1 флакон, 0,6 мл
Раствор для разведения сывороток (**РР-С**)	1 флакон, 11,0 мл
Раствор для разведения конъюгата (**РР-К**)	1 флакон, 13,0 мл
Буферный раствор для субстрата (**БРС**)	1 флакон, 13,0 мл
Хромоген ТМБ	1 флакон, 0,5 мл
Раствор хромогена (**РХ**) – ***вместо БРС и хромогена ТМБ!***	1 флакон, 13,0 мл
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (**ФСБ-Т×25**)	1 флакон, 28,0 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 6,0 мл
Комплект ванночек для реагентов с наконечниками для многоканальных пипеток	1 комплект
Клейкая пленка	3 штуки

2.2 Основные компоненты набора «ИФА-Токсо-IgG» – иммуносорбент и конъюгат.

Иммуносорбент представляет собой разборный полистироловый планшет, в лунках которого сорбирован полноразмерный рекомбинантный антиген Sag I Toxoplasma gondii.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Положительный контрольный образец – сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к Toxoplasma gondii с известным значением концентрации, МЕ/мл, и не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и Treponema pallidum и HBs-антиген, инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к Toxoplasma gondii, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, Treponema pallidum и HBs-антиген, инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 3 ч.

Принцип работы набора. При внесении в лунки планшета образцов сыворотки (плазмы) инфицированной крови человека специфические антитела к Toxoplasma gondii связываются с антигеном Toxoplasma gondii, сорбированном на поверхности лунок планшета иммуносорбента, образуя иммунные комплексы «антиген–антитело». Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов комплекс «антиген–антитело класса G–конъюгат» выявляют, добавляя в лунки планшета раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (ТМБ). При этом в лунках, содержащих специфические антитела класса G к Toxoplasma gondii, происходит изменение окраски раствора. В лунках, не содержащих специфические антитела класса G к Toxoplasma gondii, изменение окраски раствора не произойдет.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,9 М раствор серной кислоты). Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП), ОЕ, при длине волны 450 нм.

Величина ОП прямо пропорциональна концентрации специфических антител, содержащихся в образце сыворотки (плазмы) крови человека. Чем выше содержание антител класса G к Toxoplasma gondii в образце, тем выше интенсивность окрашивания раствора.

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

Формула количественного расчета специфической активности исследуемых образцов сыворотки (плазмы) инфицированной крови человека основана на статистическом методе приближения по двум точкам (ОПкрит. и ОПср $К^+$) эмпирической кривой графика зависимости оптической плотности от специфической активности, которая получена при аттестации серии набора. формула зависимости рекомендована Комитетом по Биостандартизации ВОЗ. В качестве эталона используется $К^+$, который аттестован относительно международного стандарта ВОЗ человеческого иммуноглобулина против Toxoplasma gondii (NIBSC code: 01/600) с использованием программы статистической обработки результатов ИФА «Paraline v.3.0».

2.3 Набор рассчитан на проведение **12 постановок** ИФА: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Всего – **96 определений**, включая контрольные образцы.

Продолжительность анализа составляет **1 ч 20 мин.**

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сыворотки (плазмы) крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], и [3].

3.2 Стоп-реагент, содержащий серную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Все лица, работающие в лаборатории с наборами, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

4 Правила работы с набором

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови человека необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сыворотки крови человека, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение 15 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Образцы сыворотки крови человека можно хранить при температуре (2-8) °С не более 7 суток. Замороженные образцы (желательно до температуры минус 20 °С и ниже) можно хранить не более 6 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным ростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- всю используемую для приготовления реагентов посуду нельзя обрабатывать дезрастворами и моющими средствами. В случае необходимости промыть водой питьевой проточной, а затем пять раз ополоснуть дистиллированной водой;
- для работы с хромогеном ТМБ и РХ необходимо использовать отдельные емкости для растворов и наконечники для пипеток;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;

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

- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с. Не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;

- при использовании промывателя необходимо следить за состоянием емкости для раствора для промывания планшета и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста;

- необходимо использовать пипетки автоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором с объемной долей спирта этилового 70 %. Не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;

- для работы с образцами исследуемой сыворотки (плазмы) крови человека и контрольными образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. Каждый образец сыворотки (плазмы) крови человека, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником;

- при внесении в лунки раствора Кг в рабочем разведении нельзя касаться наконечником пипетки поверхности планшета;

- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны от 450 нм до 700 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- суховоздушный термостат типа ТС-80 М2, поддерживающий температуру (37±1) °С, или аналогичный ему по характеристикам;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 до 5,0 мл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,5 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70 %;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода деионизированная или дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре **(18-25) °С в течение 30 мин.**

Все образцы сыворотки (плазмы) крови человека и реагенты набора перед проведением анализа необходимо тщательно перемешать.

Расход реагентов набора для постановки анализа, который определяется количеством используемых стрипов, приведен в таблице А.1 Приложения А.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета

Если флакон с ФСБ-Т×25 содержит осадок, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (37±1) °С до полного растворения осадка.

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

Для приготовления раствора для промывания планшета содержимое флакона с ФСБ-Т×25 необходимо разбавить в **25 раз** водой очищенной. Для этого в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флакона с ФСБ-Т×25, затем добавить дистиллированной (деионизированной) воды до метки **700 мл** и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с ФСБ-Т×25 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимый объем раствора (таблица А.1 Приложения А) в мерный стакан или цилиндр, добавить необходимое количество дистиллированной (деионизированной) воды и перемешать раствор.

Раствор для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 7 сут.

Неиспользованный ФСБ-Т×25 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.3 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.4 Подготовка $К^+$, $К^-$, РР-С, РР-К, БРС, РХ и стоп-реагента

Иммуносорбент, $К^+$, $К^-$, РР-С, РР-К, РК, БРС, РХ и стоп-реагент готовы к использованию.

Внимание! Во флаконах с РР-С и РР-К возможно выпадение осадка. Перед использованием содержимое флаконов тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Внимание! Необходимо исключить воздействие прямого солнечного света на флакон с РХ!

Неиспользованные РР-С, РР-К, БРС, РХ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Остаток $К^+$ и $К^-$ после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.5 Приготовление раствора Кг в рабочем разведении

Из флакона с Кг отобрать указанный в таблице А.1 Приложения А объем и перенести во флакон с РР-К. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон отобрать необходимое количество РР-К, добавить Кг в соответствии с таблицей А.1 Приложения А и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Раствор Кг в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием! Раствор Кг в рабочем разведении можно хранить не более 15 мин при температуре (18-25) °С. Необходимо использовать только новую ванночку для реагентов и новые наконечники!

Остаток Кг можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.6 Приготовление рабочего раствора субстрата

Если флакон с хромогеном ТМБ содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием в течение (3-5) мин при температуре (37±1) °С до полного растворения кристаллов.

Из флакона с хромогеном ТМБ отобрать указанный в таблице А.1 Приложения А объем и перенести во флакон с БРС. Содержимое флакона осторожно перемешать.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон отобрать необходимое количество БРС, добавить хромоген ТМБ в соответствии с таблицей А.1 Приложения А и осторожно перемешать раствор.

Внимание! Рабочий раствор субстрата готовить непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор можно хранить не более 20 мин при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор субстрата должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором субстрата, отмывать без применения синтетических моющих средств. Необходимо использовать только новую ванночку для реагентов и новые наконечники.

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

Остаток хромогена ТМБ можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

7 Требования к промыванию планшета

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них;
- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;
- необходимо выдерживать лунки, заполненными раствором для промывания планшета, в течение 30 с;
- при каждой аспирации тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 В лунку иммуносорбента **А-1** и в **две последние лунки в данной постановке анализа** внести по **0,1 мл (100 мкл)** $К^+$; в лунки **В1** и **С-1** внести по **0,1 мл (100 мкл)** $К^-$; в лунку **D1** внести **0,1 мл (100 мкл)** РР-С для контроля конъюгата (ККг).

Внимание! При постриповой постановке ИФА **сохраняется** порядок внесения **контрольных образцов!**

В остальные лунки внести по **0,09 мл (90 мкл)** РР-С, затем внести по **0,01 мл (10 мкл)** образцов исследуемой сыворотки (плазмы) крови человека (конечное разведение исследуемых образцов – 1:10). Раствор в каждой лунке перемешать пять раз пипетированием, при этом во время пипетирования цвет РР-С должен измениться!

Внимание! Общее время внесения в лунки иммуносорбента контрольных и исследуемых образцов не должно превышать 10 мин! Каждый образец необходимо отбирать одноразовым наконечником!

Внимание! **При необходимости** допускается проведение **оптического контроля точности внесения** контрольных образцов, РР-С и исследуемых образцов в лунки иммуносорбента (п. 9.1).

8.2 Планшет иммуносорбента заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин.**

8.3 Удалить содержимое лунок иммуносорбента с помощью промывателя, затем промыть лунки иммуносорбента раствором для промывания планшета (п 6.2) **пять раз.** Для этого необходимо внести во все лунки по (0,30-0,35) мл раствора, а затем удалить содержимое лунок иммуносорбента в емкость с дезраствором. По окончании промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом иммуносорбента в перевернутом положении (лунками вниз) по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена.

8.4 Во все лунки иммуносорбента внести **по 0,1 мл (100 мкл)** раствора Кг в рабочем разведении (п 6.5). Раствор Кг в рабочем разведении перед внесением в лунки иммуносорбента перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую ванночку.

Внимание! Время внесения в лунки иммуносорбента раствора Кг в рабочем разведении не должно превышать 10 мин! Раствор Кг в рабочем разведении необходимо вносить в лунки иммуносорбента с использованием одноразовых наконечников, прилагаемых к набору!

Внимание! **При необходимости** допускается проведение **оптического контроля точности внесения** раствора Кг в рабочем разведении в лунки иммуносорбента (п. 9.1).

8.5 Планшет иммуносорбента заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин.**

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

8.6 Удалить содержимое лунок иммуносорбента с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.2) **пять раз.**

8.7 Во все лунки иммуносорбента внести **по 0,1 мл (100 мкл)** рабочего раствора субстрата (п 6.6) или РХ в зависимости от комплектации набора. Рабочий раствор субстрата (РХ) перед внесением в лунки иммуносорбента перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую ванночку.

Внимание! Рабочий раствор субстрата (РХ) необходимо вносить в лунки иммуносорбента с использованием одноразовых наконечников, прилагаемых к набору!

Внимание! **При необходимости** допускается проведение **оптического контроля точности внесения** РХ в лунки иммуносорбента (п. 9.2).

8.8 Планшет иммуносорбента заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре **(20-25) °С в защищенном от света месте в течение 20 мин.**

Внимание! По окончании инкубации в лунках иммуносорбента с образцами сывороток, содержащими антитела класса G к Toxoplasma gondii, произойдет изменение окраски раствора различной интенсивности в зависимости от концентрации антител: от бесцветной до голубой (при использовании рабочего раствора субстрата) или от розовой до синей (при использовании РХ).

8.9 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки иммуносорбента по **0,05 мл (50 мкл)** стоп-реагента.

Внимание! В лунках иммуносорбента с образцами сывороток, содержащими антитела класса G к Toxoplasma gondii, произойдет изменение окраски раствора различной интенсивности: с голубой (синей) на желтую.

8.10 Не позже чем через 10 мин после остановки реакции определить значения ОП, ОЕ, в лунках иммуносорбента: в двухволновом режиме – **450 нм** относительно **(620-700) нм** (при использовании РХ) или в одноволновом режиме при длине волны **450 нм** (при использовании рабочего раствора субстрата). Как исключение, ОП, ОЕ, можно определять в одноволновом режиме при длине волны **450 нм** при использовании РХ.

9 Оптический контроль точности внесение реагентов в лунки иммуносорбента

9.1 При проведении спектрофотометрического контроля при длине волны 450 нм значения ОП, ОЕ, раствора в лунках, содержащих:

- $К^+$ должны быть **более 0,200 ОЕ;**
- $К^-$ должны быть **более 0,300 ОЕ;**
- РР-С с внесенными исследуемыми образцами, должны быть **более 0,100 ОЕ;**
- раствор Кг в рабочем разведении, должны быть **более 0,150 ОЕ.**

9.2 Значения ОП в лунках, содержащих раствор РХ, измеренные при длине волны **490 нм**, должны быть **более 0,080 ОЕ.**

10 Обработка результатов анализа

10.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с $К^-$ **(ОПср $К^-$)**, ОЕ.

10.2 Результаты учитывать только в том случае если:

- значение ОП в каждой из лунок с $К^+$ **(ОП $К^+$)** находиться в интервале от **0,400 до 2,800 ОЕ;**
- значение ОПср $К^-$ – **менее 0,200 ОЕ;**
- значение ОП в лунке с ККг **(ОП ККг) – менее 0,100 ОЕ;**

10.3 Качественное определение антител класса G к Toxoplasma gondii

10.3.1 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить критическое значение (ОПкрит.), ОЕ, по формуле (1):

$$ОПкрит. = ОПср\ К^- + 0{,}20 \qquad (1).$$

10.3.2 Рассчитать интервал области неопределенных значений («серая зона»). **«Серая зона»** – зона значений ОП, которая находится в интервале ОПкрит.±0,05.

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

Результат анализа считать **отрицательным** при анализе на данном наборе реагентов, если значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека **меньше** значения **ОПкрит-0,05**.

Результат анализа считать **положительным** при анализе на данном наборе реагентов, если значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека **больше** значения **ОПкрит+0,05**.

10.4 Количественное определение содержание антител класса G к Toxoplasma gondii

10.4.1 Для образцов сыворотки (плазмы) крови человека, давших **положительный результат**, вычислить **концентрацию антител** класса G к Toxoplasma gondii **(С обр.)**, МЕ/мл.

Внимание! Если значение ОП, ОЕ, образца сыворотки (плазмы) крови человека, **превышает 2,800 ОЕ**, то для вычисления **С обр.**, МЕ/мл, этот образец необходимо исследовать в более высоких конечных разведениях (**1:20** или **1:40**). Для этого образец сыворотки (плазмы) крови человека **необходимо предварительно** развести раствором для промывания планшета (п 6.2) в **2 или 4 раза** и далее исследовать как цельный образец сыворотки (плазмы) крови человека **с последующим умножением конечного результата С обр. на 2 и 4 соответственно).**

10.4.2 Количественное определение содержание антител класса G к Toxoplasma gondii можно провести, используя два варианта:

Вариант 1 (использование графика)

К набору прилагается график зависимости значений оптической плотности исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека после коррекции, (ОПкор.), ОЕ, от значений концентрации антител класса G к Toxoplasma gondii в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови человека (С обр.), МЕ/мл, построенный при выходном контроле серии набора.

1) вычислить ОПкор., ОЕ, по формуле (2):

$$\text{ОПкор.} = \frac{\text{ОП обр.} \times \text{ОПисх } K^+}{\text{ОПср } K^+} \quad (2),$$

где ОП обр. – значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека, ОЕ;

ОПисх K^+ – среднее значение ОП K^+, полученное при выходном контроле серии набора (таблица А.2 Приложения А);

ОПср K^+ - среднее значение ОП для лунок с K^+ (**ОПср K^+**), ОЕ.

2) Найти значение С обр., используя вышеуказанный график.

Вариант 2 (использование формулы или компьютерного алгоритма)

1) Вычисление С обр., МЕ/мл, провести в **2 этапа**:

1 этап. Рассчитать значение промежуточного показателя (Пп) по формуле (3):

$$\text{Пп} = \text{ОП обр.} \times \frac{\text{С } K^+}{\text{ОПср } K^+} \quad (3),$$

где ОП обр. – значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека;

С K^+ – значение концентрации антител класса G к Toxoplasma gondii в K^+, МЕ/мл, полученное при выходном контроле серии набора (таблица А.2 Приложения А, указано на этикетке флакона с K^+).

2 этап. Рассчитать значение С обр., МЕ/мл по формуле (4):

$$\text{С обр.} = 10^{(\text{Пп} - a):b} \quad (4),$$

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

где a и b – значения констант, полученные при выходном контроле серии набора (таблица А.2 Приложения А).

Пример расчета полученных данных приведен в таблице 1.

Таблица 1

ОП $К^+$ – значение ОП в лунке А-1 и в двух последних лунках в данной постановке (например, Н-12 и G-12), ОЕ	1,308; 1,402; 1,377; все значения более 0,400 и менее 2,800
ОП $К^-$ – значения ОП в лунках В-1 и С-1, ОЕ	0,041; 0,043; оба значения менее 0,200
ОП ККг – значение ОП в лунке D-1, ОЕ	0,051; значение менее 0,100
Вышеуказанные данные свидетельствуют о возможности учета результатов ИФА	
ОПкрит., ОЕ	(0,041 + 0,043): 2 + 0,2 = 0,242
Верхняя граница «серой зоны», ОЕ	0,242 + 0,05 = 0,292
Нижняя граница «серой зоны», ОЕ	0,242 – 0,05 – 0,192
ОПср $К^+$ – значения ОП в лунке А-1 и в двух последних лунках в данной постановке, ОЕ	(1,308 + 1,402 + 1,377): 3 = 1,362
С $К^+$ – по таблице А.2 Приложения А (только для данного примера), МЕ/мл	58,65
ОП обр. – значение ОП исследуемого образца, ОЕ	1,639
Пп – значение, рассчитанное по формуле (3), МЕ/мл	1,639 × 58,65 : 1,362 = 70,58
a – значение константы по таблице А.2 Приложения А (только для данного примера)	-187
b – значение константы по таблице А.2 Приложения А (только для данного примера)	139
(Пп – a): b	(70,58 – (-187) : 139 = 1,85
С обр., МЕ/мл	$10^{1,85}$ = **70,8**

2) Для упрощения процедуры вычисления значений концентрации антител класса G к Toxoplasma gondii в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови человека рекомендуется пользоваться компьютерным алгоритмом, написанным по формулам (3) и (4). Компьютерный алгоритм можно запросить в Отделе изделий медицинского назначения СП ООО «Фармлэнд» по тел/факс (017) 2889771 или **бесплатно скачать** с сайта СП ООО «Фармлэнд» по адресу: http://www.pharmland.by.

11 Интерпретация результатов

11.1 Отрицательный результат **качественного** анализа свидетельствует об отсутствии антител класса G к Toxoplasma gondii. В случае отрицательного результата анализа у беременных женщин их следует отнести к группе риска по инфицированию возбудителем токсоплазмоза.

11.2 Положительный результат **качественного** анализа свидетельствует о наличии антител класса G к Toxoplasma gondii. Для исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека, давших положительный результат, необходимо вычислить концентрацию антител класса G к Toxoplasma gondii, МЕ/мл; также рекомендуется дополнительно исследовать эти образцы на наличие антител класса М и А к Toxoplasma gondii и определить индекс авидности антител класса G к Toxoplasma gondii.

11.3 Если концентрация антител класса G к Toxoplasma gondii в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови человека **превышает 30 МЕ/мл**, индекс авидности антител класса G к Toxoplasma gondii более 60 % и антитела класса М и А к Toxoplasma gondii отсутствуют, то вероятность острого иммунного ответа мала и риск реинфекции токсоплазмоза небольшой.

11.4 Если результат **качественного анализа** находится в области неопределенных значений (**«серой зоне»**) или концентрация антител класса G к Toxoplasma gondii в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови человека **не превышает 30 МЕ/мл**, рассчитанный индекс авидности

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

антител класса G к Toxoplasma gondii не более 60 % и выявляются антитела класса M и A к Toxoplasma gondii, то существует риск недавно начавшейся инфекции или реинфекции. В этом случае требуется **дополнительно** исследовать новую порцию сыворотки (плазмы) от того же человека **через (1-2) недели** для выявления динамики антителообразования и рекомендуется консультация врача-инфекциониста.

11.5 Результат проведенного анализа **может быть недостоверным** у пациентов, страдающих различными иммунодефицитами, или прошедших процедуру переливания крови, или получавших препараты крови в течение последних двух-трех месяцев.

12 Форма выпуска набора

12.1 Набор поставляется в двух вариантах комплектации:

1 **комплект 1** – для проведения анализа **ручным способом**. Набор рассчитан на проведение **12 постановок** ИФА **на разборном планшете**: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Всего – **96 определений**, включая контрольные образцы;

2 комплект 2 – для проведения анализа на автоматическом анализаторе. Набор рассчитан на проведение 12 постановок ИФА на разборном планшете: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Всего – 96 определений, включая контрольные образцы.

13 Условия хранения и применения набора

13.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре **(2-8) °С** в течение всего срока годности.

Запрещается замораживать компоненты набора.

13.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

13.3 Срок годности набора – **12 месяцев**.

Приложение А

Таблица А.1 – Расход реагентов набора для постановки ИФА

Объем реагента, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление раствора для промывания планшета												
ФСБ-Т×25	**2,0**	**4,0**	**6,0**	**8,0**	**10,0**	**12,0**	**14,0**	**16,0**	**18,0**	**20,0**	**22,0**	**28,0**
Дистиллиров. вода	**до 50**	**до 100**	**до 150**	**до 200**	**до 250**	**до 300**	**до 350**	**до 400**	**до 450**	**до 500**	**до 550**	**до 700**
Приготовление раствора Кг в рабочем разведении												
РР-К	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**13**
Кг	**1/13c***	**2/13c***	**3/13c***	**4/13c***	**5/13c***	**6/13c***	**7/13c***	**8/13c***	**9/13c***	**10/13c***	**11/13c***	**c***
Приготовление рабочего раствора субстрата												
БРС	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**13**
Хромоген ТМБ	**1/13d***	**2/13d***	**3/13d***	**4/13d***	**5/13d***	**6/13d***	**7/13d***	**8/13d***	**9/13d***	**10/13d***	**11/13d***	**d***

* c = 0,5 мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
* d = 0,4 мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).

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

Таблица А.2 – Данные для вычисления специфической активности

ОПисх K^+, ОЕ	e*
С K^+, МЕ/мл	g*
a	h*
b	k*

* e = 2,765 МЕ/мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
* g = 58,65 МЕ/мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
* h = -187 (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
* k = 139 (величина переменная, определяется для каждой серии набора).

Библиография

[1] Санитарные правила
СП 17-69 РБ 98 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 № 18

[2] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165
О проведении дезинфекции и стерилизации учреждениями здравоохранения

[4] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.04.2010 г. № 47
Об утверждении Инструкции о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих и признании утратившими силу некоторых постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Начальник отдела изделий
медицинского назначения
СП ООО «Фармлэнд» Ю.В.Сенчук

Ведущий технолог
СП ООО «Фармлэнд» Е.И.Лаврецкая

Ведущий специалист отдела изделий
медицинского назначения
СП ООО «Фармлэнд» И.М.Богдановская

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