


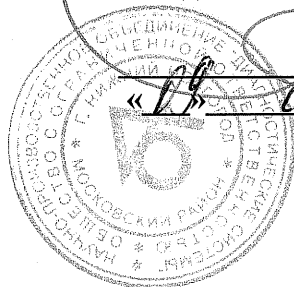
УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2010 г.
№ _____

УТВЕРЖДАЮ

**Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»**


И. Е. Колосов
2010 г.


ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-анти-ТОКСО-М (capture)»
Тест-система иммуноферментная для выявления
антител класса IgM к Toxoplasma gondii

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора	3
III. Меры предосторожности.....	4
IV. Инструкция по безопасности	4
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемое с набором реагентов	5
VI. Отбор и подготовка образцов	6
VII. Подготовка реагентов	6
VIII. Проведение анализа	7
IX. Проведение ИФА в автоматическом режиме	8
X. Результаты.....	8
XI. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	9
XII. Объяснение символов.....	9

Набор реагентов выпускается в одном комплекте.

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-анти-ТОКСО-М (capture)» предназначен для выявления антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (вариант «capture»).

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-анти-ТОКСО-М (capture)»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый 96-луночный разборный с прозрачными бесцветными лунками в которых сорбированы моноклональные антитела к IgM человека.	1 планшет
Конъюгат (концентрат x 51), жидкий – антиген <i>Toxoplasma gondii</i> , меченный пероксидазой хрена. Слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 0,3 мл
К+ (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса IgM к <i>Toxoplasma gondii</i> , не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса IgM к <i>Toxoplasma gondii</i> , не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зелёного цвета жидкость.	1 флакон 3,0 мл
PPC (раствор для предварительного разведения сывороток) – прозрачная сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
БР (блок-раствор) - прозрачная розового цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
РРК (раствор для разведения конъюгата) – слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
ПР (концентрат x 25) – промывочный раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ - Субстратный раствор, готовый к применению, жидкий. Прозрачная бесцветная жидкость. ИЛИ	1 флакон 12,0 мл ИЛИ
СБ - субстратный буферный раствор, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор водорода перекиси, рН 4,2. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл
Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'- тетраметилбензидин Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл

Планшет для предварительного разведения сывороток - планшет полистироловый 96-луночный разборный иммунологический с прозрачными бесцветными лунками	1 шт.
---	-------

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком zip-lock	1 шт.

III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий и смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многократные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду дистиллированную.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики "in vitro".
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении отрицательного

контрольного образца, положительного контрольного образца были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к гепатиту С и ВИЧ-1,2.

- При работе с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с набором реагентов с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами, реагентами, промывочными растворами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в сточную трубу. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дез. средства. Твердые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



- **xi** Некоторые реагенты содержат Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.

V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длинах волн 450 нм, 620-680 нм.
- Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
- Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
- Инкубатор микропланшетный (37,0 ± 0,5) °С.
- Устройство для промывания планшетов (вошер).
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа.
- Вода дистиллированная.
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.

VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с текущей практикой. В качестве исследуемых образцов могут быть использованы сыворотка (плазма) крови человека. Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается, т.к. может дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты готовые к применению

- К- - контрольный отрицательный образец.
- К+ - контрольный положительный образец.
- РРК - раствор для разведения конъюгата.
- РРС – раствор для предварительного разведения сывороток.
- БР - блок-раствор для рабочего разведения сывороток.
- Стоп-реагент.

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Иммуносорбент. Каждый планшет, содержащий 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в пакет. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С, при условии, что пакет герметично закрыт с помощью полиэтиленового пакета с замком Zip-Lock или с помощью скрепки. Не допускается удалять силикагель из пакета.

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (х 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. 2 и 3). Полученный раствор тщательно перемешать. Приготовленный рабочий промывочный раствор стабилен в течение 3 сут при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Рабочий раствор конъюгата. Готовить перед использованием. Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимый объем концентрата (х 51) конъюгата развести соответствующим объемом РРК (см. табл. 2 и 3). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата стабилен не более 6 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

Субстратная смесь (СС). Готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (см. табл. 2 и 3), тщательно перемешать до полного растворения. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С в химически чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

При комплектации набора ТМБ – Субстратным раствором, готовым к применению, перед использованием реагент тщательно перемешать.

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора: К+, К-, конъюгат (концентрат x 51), РРС, РРК, БР, ПР (концентрат x 25), СБ, ТМБ или ТМБ - Субстратный раствор, стоп-реагент хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С; иммуносорбент после вскрытия пакета - в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2:

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц x 51) (мкл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	2,0	48,0	20	1	0,1	1,0
2	4,0	96,0	40	2	0,2	2,0
3	6,0	144,0	60	3	0,3	3,0
4	8,0	192,0	80	4	0,4	4,0
5	10,0	240,0	100	5	0,5	5,0
6	12,0	288,0	120	6	0,6	6,0
7	14,0	336,0	140	7	0,7	7,0
8	16,0	384,0	160	8	0,8	8,0
9	18,0	432,0	180	9	0,9	9,0
10	20,0	480,0	200	10	1,0	10,0
11	22,0	528,0	220	11	1,1	11,0
12	24,0	576,0	240	12	1,2	12,0

Проведение ИФА.

1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край пакета с иммуносорбентом свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета.

После первого вскрытия пакет с иммуносорбентом стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

2. Образцы сывороток развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого в лунки планшета для предварительного разведения внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл сывороток и тщательно перемешать осторожным пипетированием. При этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый. Если цвет раствора в лунке не изменился, то сыворотка не была внесена. Разведенные сыворотки не хранить!

3. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

1 стрип – 1 лунка К+ и 2 лунки К-

2 стрипа – 1 лунка К+ и 3 лунки К-

3 и более – 2 лунки К+ и 3 лунки К-

Например, при постановке ИФА на целом планшете, в лунки стропа А-1 и В-1 пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К+, в 3 лунки С-1, D-1 и Е-1 - по 100 мкл К-. В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл БР и по 10 мкл предварительно разведенных в 10 раз образцов исследуемых сывороток (конечное разведение сывороток 1:100). Содержимое лунок перемешать осторожным пипетированием. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вошера или многоканальной пипетки) и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (от 380 до 400 мкл в лунку), выдерживая 40 сек и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать в термостате 60 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, после чего планшет промыть 5 раз, как указано в п. 4.

6. **ВНИМАНИЕ!** В зависимости от комплектации набора возможны два варианта последующего проведения анализа.

1 вариант. При комплектации набора ТМБ - Субстратным раствором, готовым к применению.

Во все лунки планшета внести по 100 мкл ТМБ – Субстратного раствора и выдержать 20 мин при температуре от 18 до 24 °С в защищённом от света месте.

2 вариант. При комплектации набора ТМБ и Субстратным Буфером (СБ). Приготовление Субстратной Смеси (СС), (см. раздел VII Подготовка реагентов. п. 2 Реагенты, требующие предварительного приготовления).

Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать 20 мин при температуре от 18 до 24 °С в защищённом от света месте.

7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и спустя 3-4 мин. провести учет результатов.

IX. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА В АВТОМАТИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ

При постановке тест-системы на автоматическом ИФА - анализаторе следуйте инструкции изложенной выше, п. VII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Протоколы для постановки и обсчета результатов тест-системы Вы можете получить в ООО «НПО «Диагностические системы».

Таблица 3

Расход реагентов тест-системы на один планшет при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Субстратная смесь	
	ПР (конц. x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 51) (мкл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
12 (целый планшет)	24,0	576,0	240,0	12,0	1,20	12,0

X. РЕЗУЛЬТАТЫ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм.

Реакцию учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунке с К- - не более 0,2, а среднее значение ОП растворов в лунках с К+ - не менее 0,6.

ОП крит. рассчитывать по формуле:

ОП крит. = ср. знач. ОП К- + А

где: А - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата.

Результат анализа сывороток считать положительным, если значение ОП исследуемого образца выше 1,1 x ОП крит.

Результат анализа сывороток считать отрицательным, если значение ОП исследуемого образца ниже 0,9 x ОП крит.

Если значение ОП исследуемого образца превышает 0,9 x ОП крит., но меньше значения 1,1 x ОП крит., этот образец считать неопределенным. В этом случае необходимо повторное исследование сыворотки крови пациента на антитела к *Toxoplasma gondii* в динамике – через 1-2 недели после первого забора крови. Желательно, чтобы повторно взятый образец анализировался с предыдущим (парные сыворотки), что позволит с большей достоверностью оценить динамику специфических антител.

XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ




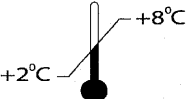


Срок годности - 13 месяцев. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП «Росздравнадзора» по адресу: 117051, г. Москва, Научный пр-д, 14А, тел.(499)120-60-95,120-60-96 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru; www.npods.ru.

XII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка
	Только для лабораторного использования
	Код партии (номер серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению



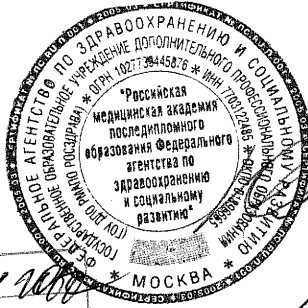
Xi

Содержит раздражающее вещество

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО
Зав.кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»
д.м.н, профессор



В.В. Долгов

Подпись *В.В. Долгов*
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись *В.В. Долгов*