

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра  
здравоохранения  
Республики Беларусь



В.Е.Шевчук

"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

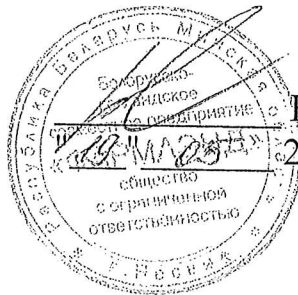
СОГЛАСОВАНО  
Зам директора  
РУП «Центр экспертиз и  
испытаний в здравоохранении»

С.И. Зинченко  
"08" 2011 г.



СП ООО «Фармлэнд»  
Генеральный директор

В.В. Сенчук  
2011 г.



## 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 (K <sup>+</sup> )	1 флакон, 3,0 мл
Отрицательный контрольный образец (K <sup>-</sup> )	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) – <i>вместо БРС и хромогена ТМБ!</i>	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.

**Формула количественного расчета специфической активности** исследуемых образцов сыворотки (плазмы) инфицированной крови человека основана на статистическом методе приближения по двум точкам (ОПкрит. и ОПср  $K^+$ ) 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  $K^+$ , 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 проростом, 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;

- 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  $(37\pm 1)$  °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  $(37\pm 1)$  °С до полного растворения осадка.

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

Иммуносорбент,  $K^+$ ,  $K^-$ , 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  $K^+$  и  $K^-$  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.

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)  $K^+$ ; в лунки В1 и С-1 внести по 0,1 мл (100 мкл)  $K^-$ ; 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.

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 внесения реагентов в лунки иммуносорбента

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

- K<sup>+</sup> должны быть **более 0,200 ОЕ**;
- K<sup>-</sup> 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 K<sup>-</sup> (ОПср K<sup>-</sup>), ОЕ.

10.2 Результаты учитывать только в том случае если:

- значение ОП в каждой из лунок с K<sup>+</sup> (ОП K<sup>+</sup>) находится в интервале от **0,400 до 2,800 ОЕ**;

- значение ОПср K<sup>-</sup> – **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):

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПср K}^{-} + 0,20 \quad (1).$$

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

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):

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

где ОП обр. – значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека, ОЕ;  
ОПср К<sup>+</sup> – среднее значение ОП К<sup>+</sup>, полученное при выходном контроле серии набора (таблица А.2 Приложения А);

ОПср К<sup>+</sup> - среднее значение ОП для лунок с К<sup>+</sup> (**ОПср К<sup>+</sup>**), 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):

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

где ОП обр. – значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека;  
С К<sup>+</sup> – значение концентрации антител класса G к *Toxoplasma gondii* в К<sup>+</sup>, МЕ/мл, полученное при выходном контроле серии набора (таблица А.2 Приложения А, указано на этикетке флакона с К<sup>+</sup>).

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

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



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 <sup>+</sup> – 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 <sup>-</sup> – 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	
ОП <sub>крит.</sub> , 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	$0,242 - 0,05 = 0,192$
ОП <sub>ср</sub> К <sup>+</sup> – 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 <sup>+</sup> – 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	$1,639 \times 58,65 : 1,362 = 70,58$
$a$ – 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 M и A 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 M и A 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

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
<i>Приготовление раствора для промывания планшета</i>												
<b>ФСБ-Т×25</b>	<b>2,0</b>	<b>4,0</b>	<b>6,0</b>	<b>8,0</b>	<b>10,0</b>	<b>12,0</b>	<b>14,0</b>	<b>16,0</b>	<b>18,0</b>	<b>20,0</b>	<b>22,0</b>	<b>28,0</b>
<b>Дистиллиров. вода</b>	до <b>50</b>	до <b>100</b>	до <b>150</b>	до <b>200</b>	до <b>250</b>	до <b>300</b>	до <b>350</b>	до <b>400</b>	до <b>450</b>	до <b>500</b>	до <b>550</b>	до <b>700</b>
<i>Приготовление раствора Кг в рабочем разведении</i>												
<b>РР-К</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
<b>Кг</b>	<b>1/13<sup>*</sup></b>	<b>2/13<sup>*</sup></b>	<b>3/13<sup>*</sup></b>	<b>4/13<sup>*</sup></b>	<b>5/13<sup>*</sup></b>	<b>6/13<sup>*</sup></b>	<b>7/13<sup>*</sup></b>	<b>8/13<sup>*</sup></b>	<b>9/13<sup>*</sup></b>	<b>10/13<sup>*</sup></b>	<b>11/13<sup>*</sup></b>	<b>с<sup>*</sup></b>
<i>Приготовление рабочего раствора субстрата</i>												
<b>БРС</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
<b>Хромоген ТМБ</b>	<b>1/13<sup>d</sup></b>	<b>2/13<sup>d</sup></b>	<b>3/13<sup>d</sup></b>	<b>4/13<sup>d</sup></b>	<b>5/13<sup>d</sup></b>	<b>6/13<sup>d</sup></b>	<b>7/13<sup>d</sup></b>	<b>8/13<sup>d</sup></b>	<b>9/13<sup>d</sup></b>	<b>10/13<sup>d</sup></b>	<b>11/13<sup>d</sup></b>	<b>d<sup>*</sup></b>
* с = 0,5 мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).												
* d = 0,4 мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).												

Таблица А.2 – Данные для вычисления специфической активности

ОПисх К <sup>+</sup> , ОЕ	e*
С К <sup>+</sup> , 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