

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	2
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

Инструкция составлена руководителем исследовательского отдела ООО «ХЕМА»,
к. м. н. Ю.С. Лебединым.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К *TOXOPLASMA GONDII* В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Токсоплазма IgM-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Токсоплазмоз – паразитарное заболевание, возбудителем которого является внутриклеточный паразит *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*). Инфицирование *T.gondii* редко приводит к заболеванию и, обычно, клинические симптомы отсутствуют. В случае развития заболевания токсоплазмоз протекает латентно, либо хронически. Особое значение имеет проблема своевременного выявления инфекции у беременных женщин и у больных с подавленной иммунной системой. Последствия первичной инфекции матери в период беременности в 30-50% случаев приводят к прерыванию беременности или рождению ребенка с физическими и умственными недостатками.

1.3. При токсоплазмозе специфические антитела класса IgM в большинстве случаев являются маркерами активного размножения токсоплазм. Антитела этого класса появляются на второй неделе инфицирования, их титры повышаются до 6-8 недели и постепенно снижаются. У пациентов с нормальным иммунным статусом диагноз первичного инфицирования подтверждают появлением специфических антител классов IgM и IgG. Кроме того, выявление специфических антител класса IgM может указывать на реактивацию хронического токсоплазмоза.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к IgM. Антитела из образца связываются с антителами к IgM на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата антигена *T.gondii* с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность и чувствительность. Набор реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА» определяет коммерческую панель сывороток *Toxoplasma IgM Positive Control* РТТ201 производства Boston Biomedica Company (США) в соответствии с паспортными данными и коррелирует со значениями, полученными на наборе реагентов Abbott EIA Тохо-IgM (lot 04667M201). Панель содержит 6 положительных и 19 отрицательных образцов. При исследовании специфичности с использованием 93 сывороток, отрицательных на антитела класса IgM к *T.gondii* на наборах реагентов DiaSorin (Италия) и NovaTec (Германия), все образцы были определены как отрицательные

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «Токсоплазма IgM-ИФА» не превышает 8,0%.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях набора реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА» (Intra-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ОП средняя	CV1, %	CV2, %
1	32	2.018	3.2	4.4
2	32	0.548	5.1	5.8

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии набора реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ОП средняя	CV1, %
1	8	1.918	4.7
2	8	0.58	6.8

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P101MZ	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN101MZ CP101MZ	CONTROL – CONTROL +	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антител класса IgM к <i>Toxoplasma gondii</i> , готовы к использованию (0.5 мл и 0.2 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T101MXZ	CONJ 11X	Концентрат конъюгата (1.25 мл)	1	шт	прозрачная жидкость ярко-синего цвета
4	ST101MZ	DIL CONJ	Буфер для разведения концентрата конъюгата , готов к использованию (12.5 мл)	1	шт	прозрачная жидкость желтого цвета
5	SP101M	DIL	Буфер для разведения образцов , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
6	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21x-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
10	K101MIR	-	Инструкция по применению Набора реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА»	1	шт	-
11	K101MQ	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2Б.

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °С
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25$ °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2-8$ °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

7.4. Приготовление конъюгата.

Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки!

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Токсоплазма IgM-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- концентрат конъюгата, буфер для разведения концентрата конъюгата, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 месяцев

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора.

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2-8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышьиные антитела.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка)
2	Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл для разведения концентрата конъюгата
3	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл буфера для разведения образцов.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

5	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +37 °С.
7	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, спомощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
8	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
11	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидаина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидаина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
12	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидаина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
13	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
14	<p>Рассчитайте содержание антител класса IgM к Toxoplasma gondii в исследуемых образцах. Для этого:</p> <p>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля: $\text{ОП (CN101MZ)}_{\text{Ср}} = (\text{ОП1 (CN101MZ)} + \text{ОП2 (CN101MZ)} + \text{ОП3 (CN101MZ)}) / 3;$ Результаты анализа считать достоверными, если - ОП Положительного контроля не ниже 1.5 оптических единиц (ОЕ) - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках - ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения отрицательного контроля, т. е. $\text{ОП (CN101MZ)}_{\text{Ср}} \times 0.5 < \text{ОПn (CN101MZ)} < \text{ОП (CN101MZ)}_{\text{Ср}} \times 2.0$ если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN101MZ)Ср</p> <p>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2 Cut off = ОП (CN101MZ)Ср + 0.2</p> <p>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off ИП = ОПобразца / Cut off</p>

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

При ИП > 1.1 образец положительный,

при ИП < 0.9 – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Дубининская Г. М., Изюмская О. М., Козюк П. М. и др. // Токсоплазмоз. Клиника, диагностика и лечение // Вети медицины и фармации. – 2003 – №1 – с.23-25
2. Desmonts G., Daffos F., Forestier F. et al. Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis // Lacent. – 1985 – Vol. 8427, №1 – p.500-504
3. Genum P. A., Stray-Pedersen B., Gundersen A. Impruved Diagnosis of Primary Toxoplasma Gondii Infection in Early Pregnancy by Determination Antitoxoplasma Immunoglobulin G Avidity // Journal of Clinical Microbiology. – 1997 – №8 – p.1972-1977
4. S. Singh. Mother-to-child transmission and diagnosis of Toxoplasma Gondii infection during pregnancy // Indian Journal of Medical Microbiology. – 2003 – Vol. 21, №2 – p.69-76
5. Tenter A. M., Heckeroth A. R., Weiss L. M. Toxoplasma gondii: from animals to humans // International Journal of Parasitology. – 2000 – №30 – p.1217-1258

По вопросам, касающимся качества Набора «Токсоплазма IgM-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)
электронная почта: info@xema.ru
интернет: www.xema.ru

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА», к. м. н. Ю. С. Лебедин