



- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфические реагенты

- **Покрытый микропланшет:** 1 микропланшет для 96 делимых лунок с покрытым очищенным неактивным антигеном токсоплазмы. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой пакете (емкости для микропланшета), тщательно закрытым.
- **Контроль низкой avidности:** 1 флакон основы сыворотки с человеческим анти-токсоплазма IgG низкой avidности. Лиофилизированный, красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Перед использованием разбавить содержимое флакона 2 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течение 2 месяцев; при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Контроль высокой avidности:** 1 флакон основы сыворотки с человеческим анти-токсоплазма IgG высокой avidности. Лиофилизированный, синего цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Перед использованием разбавить содержимое флакона 2 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течение 2 месяцев; при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Диссоциирующий реагент:** 1 флакон (10 мл) мочевины в растворе буфера. Готовый к использованию.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиноного моноклонального анти-человеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) в основе сыворотки со стабилизаторами. Готов к использованию, розового цвета. Консервант: неомидин.

3.2 Общие реагенты для наборов следующих направлений: To.R.C.H. - S.T.D., детские болезни.

- **Промывочный раствор (концентрированный):** 1 флакон (50 мл) PBS-tween 20. Консервант: тимеросал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8°C. В случае нерасворимых кристаллов, ресуспендируйте раствор, поместив флакон в инкубационную камеру на несколько минут при 37°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить разведенный разбавитель образцов в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером, DMSO и H₂O₂. Готовый к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовая сумка.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный фотометр для измерения абсорбций с интервалом 0-3,0 А при 450 и 405 нм.

Иммуноферментный набор для определения avidности IgG антител анти-Токсоплазмы в человеческой сыворотке или плазме

Кат. № : K1TGA
Количество тестов: 45
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 02-2006
Версия 8

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Toxoplasma gondii – внутриклеточный протозойный паразит, причиняющий инфекции, которые ведут к различным клиническим последствиям. Около 80-90% инфекций токсоплазмы, случающихся в иммуно-компетентных подростках или взрослых – бессимптомные. Клинические признаки (лимфаденит, лимфоцитоз и миалгия) в любом случае незначительные и в общем проявляются в легкой форме. Вместо этого, первичная инфекция токсоплазмы, приобретенная во время беременности, может привести к генитальному токсоплазмозу с последующим хориоретинитом и повреждением нервной системы. Такие последствия особенно проявляются в течение первых шести месяцев беременности. Диагностика недавно приобретенной первичной инфекции токсоплазмы не является легкой, поскольку антитела класса IgM (типичный маркер недавних инфекций), образовавшиеся во время токсоплазмоза, могут существовать в течении многих месяцев и даже лет. Измерение avidности специфических IgG антител оказалось крайне полезным для этой цели. В действительности, первичная реакция IgG антитела на инфекцию характеризуется антителами с низкой avidностью, где связывание с областями специфичного антигена легко диссоциируется.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор основывается на методе иммуноферментного анализа (ELISA), где сыворотка пациента в двойном экземпляре реагирует с антигеном токсоплазмы, покрывающим микропланшет. После первой инкубации, сопровождающейся промывкой микропланшета, лунки с репликатами инкубируются, каждая с другим раствором буфера, один из которых содержит мочевины. Реагент мочевины ведет к диссоциации предварительно образовавшегося связывания антиген-антитела. Степень диссоциации зависит от avidности данного антитела. После дальнейшего цикла промывки антитела, которые все еще связаны с твердой фазой, проявятся в последующих реакциях, сначала с анти-человеческим IgG антителом (конъюгированным пероксидазой хрена), а затем с раствором хромогена (тетраметилбензидином, ТМВ) в субстратном буфере. Колориметрическое считывание проводится с использованием спектрофотометра при 450 и 405 нм. Затем вычисляется соотношение между оптическими плотностями двух лунок и отображается как процент avidности.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок, что соответствует 45 анализам.
- хранить набор при 2-8°C.
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона

- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре,
 это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизованные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое

оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.

- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может причинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течение 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ). Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разведенного разбавителя образца).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Позвольте реагентам и образцам нагреться до комнатной температуры.
 - Переворачивая образцы, смешайте их перед использованием.
- 7.1 Приготовьте лунки в двойном экземпляре для: бланка, контроля низкой avidности, контроля высокой avidности и образцов.

- 7.2 Внесите **100 мкл** контроля низкой avidности в лунки С1 и D1; **100 мкл** контроля высокой avidности в лунки Е1 и F1; **100 мкл** первого (разбавленного) образца в лунки G1 и H1; аналогично продолжайте со всеми другими образцами.
- 7.3 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-2 минут при 37+/-2°C**.
- 7.4 Соберите инкубационную смесь и промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 7.5 Внесите **100 мкл** разбавителя образца в непарные лунки (A1, C1, E1, G1 и т.д.) и **100 мкл** диссоциирующего реагента в парные лунки (B1, D1, F1, H1 и т.д.).
- 7.6 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-2 минут при 37+/-2°C**.
- 7.7 Аспирируйте и промойте лунки как описано в п 7.4.
- 7.8 Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
- 7.9 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
- 7.10 Аспирируйте и промойте лунки как описано в п 7.4.
- 7.11 Внесите **100 мкл** хромогена во все лунки.
- 7.12 Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2°C**.
- 7.13 Внесите **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 7.14 Считайте абсорбцию лунок желательно с помощью бихроматичного спектрофотометра при **450 нм** с контрольной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 с лункой бланка). В случае избытка значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание должно быть завершено в течении **15 минут** после завершения анализа.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 22 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ*

9.a Отнимите значение бланка (средняя ОП лунок A1 и B1).

9.b При использовании каждого образца убедитесь, что ОП лунок инкубируемых с разбавителем образца - > 0,300. Если так, можете продолжать. Если нет, образец не достаточно концентрирован для оценки avidности IgG (пациенты отрицательны к инфекции токсоплазмы или пациенты инфицированы, но реакция антител пока что слишком слабая).

9.c Для каждого образца и контроля вычислите процентное соотношение между ОП лунки, обработанной диссоциирующим реагентом и ОП лунки, обработанной разбавителем образца. Это соотношение будет составлять процент avidности образца/контроля.

ОП с диссоц. реагентом $\times 100 = \% \text{ avidности}$

ОП с разбавителем образца

9.d Образцы с ОП >3.000 при 450 нм в любой лунке необходимо считать при 405 нм. В таких случаях необходимо вычислить прецент avidности, основываясь на считывании в п. 9.c.

* Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет выполняться автоматически при 3 различных волнах длиной: 450, 405 и 620 нм, таким образом позволяя расширить диапазон кривой.

9.1 Пример вычисления

Образец	ОП с разбав. образца	ОП с диссоц. реагентом	% avidности
К. низк. avidности	1,276	0,031	2,4
К. высок. Avidности	1,475	0,580	39,3
Образец	0,766	0,127	16,6

9.2 Критерии достоверности

ОП при 450 нм контроля и низкой и высокой avidности в лунках, обработанных разбавителем образца должна быть более чем 0,500.

Процент avidности (вычисленный выше) должен быть меньше 20% для контроля низкой avidности и более 30% для контроля высокой avidности. В любом случае, результаты должны основываться на клинической оценке и дальнейших диагностических исследованиях.

9.3 Интерпретация результатов

% avidности > 30% =	IgG анти-токсоплазма с высокой avidностью
% avidности 20-30% =	IgG анти-токсоплазма со средней avidностью (серая зона)
% avidности < 20% =	IgG анти-токсоплазма с низкой avidностью

10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность была метода была оценена на панели клинических образцов с прошлой или вторичной инфекцией. Результат составил 90%.

10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на панели клинических образцов с первичной инфекцией. Результат составил 89%.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность можно определить как способность анализа точно обнаруживать специфичный аналит в присутствии потенциально влияющих факторов в основе образца. Контролируемые исследования потенциально влияющих веществ показали, что на эффективность анализа не повлияли антикоагулянты (ЭДТА и гепарин).

10.5 Точность

Точность была оценена на аппарате Radim путем определения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабельности внутри и между анализами) на 3 сыворотках при разном % avidности.

Повторяемость (внутри анализа)

Сыворотка	Среднее	+/- (Avidность %)	CO	KB (%)	К-во реплика-тов
a	13,9	+/-	1,6	11,6	10
b	32	+/-	4	13,4	10
c	52	+/-	5	10,1	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Среднее	+/- (Avidность %)	CO	KB (%)	К-во реплика-тов
a	23,9	+/-	2,9	12	10
b	42,5	+/-	4,7	11,1	10
c	75,6	+/-	8,8	11,6	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результат высокой avidности не исключает возможности недавней инфекции. Другой стороны, при высокой специфичности анализа положительный результат сильно указывает на инфекцию в течении предыдущих 3 месяцев.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com