



**Набор ИФА
для определения в человеческой сыворотке
или плазме антител класса IgM к
ТОКСОПЛАЗМЕ**

Кат. № : K1TG; K1TGB
Количество тестов: 96; 192
Производитель : Radim (Италия)

*Методика от 02-2006
Версия 10*

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

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

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 течении 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 авидности специфических IgM антител оказалось крайне полезным для этой цели. В действительности, первичная реакция IgM антитела на инфекцию характеризуется антителами с низкой авидностью, где связывание с областями специфического антигена легко диссоциируется.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор основывается на методе иммуноферментного анализа (ELISA), где пероксидаза хрена используется в качестве ферментного конъюгата. В течение первой инкубации антитела класса IgM к токсоплазме в образце, если имеются, связываются с антигеном токсоплазмы, нанесенным на лунки. Цикл промывки устраняет весь несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (античеловеческое IgM, конъюгированное пероксидазой), связывается с комплексом токсоплазма-антиген-антитело. После дальнейшего цикла промывки бесцветный раствор хромогена (тетраметилбензидина, ТМБ) в буфере субстрата добавляется в лунки где он, реагируя с ферментом пероксидазы образует цветное соединение. Развитие цвета будет остановлено при добавлении H₂SO₄. Интенсивность цвета, измеряемая на спектрофотометре при 450 нм и 405 нм, будет таким образом прямо пропорциональной концентрации анти-токсоплазма антител класса IgM в калибраторах и образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок (кат. K1TG), или для 192 лунок (кат. K1TGB).
- хранить набор при 2-8°C.
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона.
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфические реагенты

- **Привитый микропланшет:** 1 планшет на 96 делимых лунок покрытых вирусным антигеном токсоплазмы. Держите неиспользованные лунки при 2-8°C в поставляемом полиэтиленовом пакете тщательно закрытым.
- **Положительный контроль:** 1 флакон (2 мл) основы сыворотки, реактивной к анти-токсоплазмы IgM. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовый к использованию.
- **Пороговый (cut-off) контроль:** 1 флакон (2,5 мл) основы сыворотки, реактивной к анти-токсоплазмы IgM. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовый к использованию. синего цвета.
- **Антиген токсоплазмы:** 7 флаконов, содержащие инактивированный антиген плазмы, лиофилизированный. Перед использованием перерастворить каждый флакон 2,5 мл

биотинилированного конъюгата. Хоанить перерастворенный реагент в течение 10 дней при 2-8°C.

- **Биотинилированный конъюгат:** 1 флакон (19 мл) моноклональноо анти-токсоплазма антитела, конъюгированного биотином. Консервант: неомидин. Готовый к использованию.
- **Ферментный конъюгат:** флакон (14 мл) стрептавидина, конъюгированного пероксидазой хрена в основе сыворотки со стабилизаторами. Консервант: неомидин. Готовый к использованию.

**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. В случае нерасворимых кристаллов, перерастворить раствор, поместив флакон в инкубационную камеру на несколько минут при 37°C. Хранить разбавленный промывочный раствор в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (100 мл) основа сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%).
- **Отрицательный контроль:** 1 флакон (2 мл) основа сыворотки, неактивная с анти-токсоплазма IgM. Готовый к использованию, красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Сыворотка отрицательного контроля должна использоваться как: 1) контроль в качественном анализа, и 2) калибратор в точке концентрации 0 PE/мл количественного анализа.
- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером, ДМСО и H₂O₂. Готовый к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

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.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводится 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 специфические 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 содержащей 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 лиофилизированные 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. Недостаточная 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 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 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. Используемые для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержать 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. Умеренно липемические образцы не влияют на результаты; высоко липемические или или гемолизированные образцы могут влиять на результаты. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при $2-8^\circ\text{C}$ в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C . Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Перед использованием разбавьте образцы 1:100 разбавителем образца (Пример: 10 мкл образца + 990 мкл разбавителя).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Позвольте реагентам и образцам нагреться до комнатной температуры.
- Переверачивая образцы, смешайте их перед использованием.
- 7.1 Приготовьте лунки в дубле для одного бланка, контролей и образцов.
- 7.2 Пипетируйте в соответствующие лунки по **100 мкл** контролей и разбавленных образцов.
Примечание: контроли не должны разбавляться.
- 7.3 Пипетируйте по **100 мкл** разбавителя образца в лунку бланка.
- 7.4 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-5 минут при $37\pm 2^\circ\text{C}$** .
- 7.5 Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 7.6 Внесите по **100 мкл** антигена, перерастворенного биотинилированным конъюгатом во все лунки.
- 7.7 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-5 минут при $37\pm 2^\circ\text{C}$** .
- 7.8 Промойте лунки как описано в п. 7.5.
- 7.9 Пипетируйте по **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
- 7.10 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при $37\pm 2^\circ\text{C}$** .
- 7.11 Промойте лунки как описано в п. 7.5.
- 7.12 Пипетируйте по **100 мкл** хромогена во все лунки.
- 7.13 Инкубируйте лунки в течении **10 минут при $37\pm 2^\circ\text{C}$ или 15 минут при комнатной температуре ($18-25^\circ\text{C}$)**.
- 7.14 Пипетируйте по **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 7.15 Считайте абсорбцию лунок желательно с помощью бихроматичного спектрофотометра при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 лункой бланка). В случае избытка значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание должно быть проведено 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. 24 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ*

9.1 Качественный анализ

Должна приниматься во внимание ОП каждого отрицательного, положительного и порогового контроля. Наличие или отсутствие антител анти-токсоплазма IgM определяется сравнением абсорбции образца с абсорбцией cut-off контроля (пороговое значение). Образцы с ОП ниже cut-off контроля считаются неактивными к антителам анти-токсоплазма IgM. Образцы с ОП выше чем в cut-off контроля считаются реактивными к антителам анти-токсоплазма IgM. Образцы со значениями абсорбции в пределах $\pm 10\%$ cut-off контроля считаются сомнительными и должны быть подтверждены повторным анализом.

*Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрические считывания будут проводиться автоматически при 3 разных длинах волны: 450, 405 и 620 нм, таким образом позволяя расширить диапазон кривой.

9.2 Количественный анализ

Отрицательный контроль берется за первую точку калибровочной кривой (значение 0 PE/мл) и, соответственно, как часть кривой. Нарисуйте калибровочную кривую на линейной графической бумаге, выводя концентрации калибратора (ось x) против абсорбций, полученных для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации анти-токсоплазма в PE/мл получают путем интерполяции абсорбции каждого образца на калибровочной кривой.
— Образцы со IgM значениями меньше 15 PE/мл считаются неактивными к анти-токсоплазма IgM антителам.
— Образцы со IgM значениями больше 30 PE/мл считаются реактивными к анти-токсоплазма IgM антителам.
— Образцы со IgM значениями между 15 и 30 PE/мл считаются слабо реактивными.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание проводится автоматически при 3 различных значениях длины волны: 450, 405 и 620 нм, тем самым расширяя диапазон кривой.

9.1 Пример вычисления

Последующие значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание	ОП при 450 нм
Отрицательный контроль	0,082
Пороговый контроль	0,504
Положительный контроль	1,500
Образец	0,889

Исследуемый образец оказался положительным к антителам анти-токсоплазма IgM.

9.2 Критерии достоверности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что абсорбции контролей находятся в пределах следующих ожидаемых значений:

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль	< 0.200
Положительный контроль	> 0.700

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

9.5 Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы должны считаться отрицательными к антителам анти-токсоплазма IgM.
- Реактивные образцы должны считаться положительными к антителам анти-токсоплазма IgM.
- Сомнительные образцы должны оцениваться критически, или повторно проверяться для подтверждения.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на группе 183 образцов, отрицательных к анти-токсоплазма IgM. Результат составил 98,2 %.

10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на группе 124 образцов с острой инфекцией токсоплазмы. Результат составил 98.1 %.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена как способность анализа точно обнаруживать определенный аналит в присутствии потенциально интерферирующих факторов в основе образца. Контролируемые изучения потенциально интерферирующих веществ показали, что на эффективность анализа антикоагулянты не воздействуют (ЭДТА и гепарин).

10.4 Точность

Точность была оценена на аппарате Radim, определяющем повторяемость и воспроизводимость анализа (вариативность в пределах и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях анти-токсоплазма IgM.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн.	± (О/ПЗ)	СО	КВ %	Репликации, к-во
a	4,46		0,15	3,45	10
b	1,73		0,06	3,39	10
c	0,96		0,02	2,56	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн.	± (О/ПЗ)	СО	КВ %	Репликации, к-во
a	1,72		0,18	10,4	10
b	5,41		0,51	9,48	10
c	1,40		0,10	6,99	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

В определении уровня иммунитета пациента к *Toxoplasma gondii*, наличии антител класса IgM на любом уровне не исключает возможности продолжающейся инфекции. Поэтому, анализ на специфические антитела класса IgM является важным для раннего диагноза острых инфекций. В случае болезни быстрое вмешательство значительно уменьшит риски. Использование «захватывающего» иммуноферментного анализа значительно сокращает возможность неспецифических результатов. Однако результаты анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua