

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ІgG ДО ТОКСОПЛАЗМИ

Кат. №: **LUA-TOXOG.CE**
Кількість тестів: **96**

Дата випуску інструкції: **11-2019**
Версія: **6**

Імуноферментний аналіз для визначення антитіл ІgG до Toxoplasma gondii у плазмі та сироватці людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл класу ІgG до Toxoplasma gondii у плазмі та сироватці людини. Тільки для діагностики «in vitro».

В. ВСТУП

Toxoplasma gondii - облигатний внутрішньоклітинний найпростіший паразит, який, ймовірно, здатний заразити всі види ссавців, включаючи людину. Виявлення антитіл ІgM до T.gondii особливо корисне для діагностики гострих інфекцій у осіб з «ризиком», у зв'язку зі СНІДом, трансплантацією органів та вагітністю. Оскільки більшість інфекцій T.gondii є легкими або безсимптомними у здорових людей, виявлення антитіл ІgM специфічних до T.gondii, за відсутності виявлених специфічних ІgG, стало важливим для моніторингу гострих інфекцій у вагітних, оскільки паразит може призводити до серйозних вроджених вад. Крім того, оскільки інфекції T.gondii найбільш важкі у пацієнтів з ослабленим імунітетом, де захворювання може бути смертельним, гострі інфекції, викликані цим паразитом, слід відрізнити від інших розладів. Нещодавно розроблені аналізи захоплення ІgM дають клініцисту корисний і надійний тест, на який не впливає ревматоїдний фактор, як це буває в класичних сендвіч-тестах.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті нативними антигенами T.gondii, високоочищеними шляхом центрифугування з градієнтом сахарози та інактивованими.

Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком, і ІgG до T.gondii захоплюються, якщо вони є, антигенами.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані анти-ІgG T.gondii виявляються шляхом додавання поліклональних специфічних антитіл до hlgG, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл ІgG проти T.gondii, присутніх у зразку. Калібрувальна крива, відкалібрована за 3-м міжнародним стандартом ВООЗ, дає можливість кількісного визначення антитіл ІgG у пацієнта.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок по 8 мікролунок, покритих очищеною та інактивованою гамма-опроміненням Toxoplasma gondii, у присутності бичачих білків.

Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Дайте мікропланшету досягти кімнатної температури перед відкриттям; повторно закрити невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігати при температурі 2..8 °C (°C).

2. Калібрувальна крива CAL №...

Готова до використання, кодована за кольорами, стандартна крива, відкалібрована за 3-м міжнародним стандартом, розробленим Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ). Діапазон калібрувальної кривої такий:

4 мл (ml) CAL1 = 0 МО/мл (IU/ml) ВООЗ
4 мл (ml) CAL2 = 50 МО/мл (IU/ml) ВООЗ
2 мл (ml) CAL3 = 100 МО/мл (IU/ml) ВООЗ
2 мл (ml) CAL4 = 250 МО/мл (IU/ml) ВООЗ
2 мл (ml) CAL 5 = 500 МО/мл (IU/ml) ВООЗ
4 мл (ml) CAL6 = 1000 МО/мл (IU/ml) ВООЗ.

Вони містять позитивну плазму Тохо ІgG, титровану проти третього міжнародного стандарту ВООЗ ТОХМ, 10 мМ (mM) На-цитратного буфера рН 6.0 +/- 0.1, 2% казеїну, 0.1% Твін 20, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти мають синій колір.

3. Контрольна сироватка CONTROL...

1 флакон. Ліофілізована. Розчиняється з об'ємом води класу EIA, зазначеним на етикетці. Містить бичачу сироватку плоду, 0.045% ProClin 300 та 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину як консерванти і людську плазму, позитивну до T.gondii, калібровану на 250 МО/мл (IU/ml) +/- 10%, вміст якої калібрується за 3-м міжнародним стандартом, розробленим Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ - ТОХМ).

Примітка: Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакона, може змінюватися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.

4. Концентрат Промивного буфера WASHBUF 20X

1x60 мл (ml)/пляшка. 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буфера рН 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.045% ProClin 300.

5. Ферментний кон'югат CONJ

2x8 мл (ml)/флакон. Готовий до використання та кодований червоним кольором. Містить кон'юговані поліклональні антитіла Пероксидази хрому до людського ІgG, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер рН 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300, 0.02 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину як консерванти та 0.01% червоний харчовий барвник.

6. Хромоген/Субстрат SUBS TMB

1x16 мл (ml)/флакон. Містить 50 мМ (mM) розчину цитратно-фосфатного буфера, рН 3.5-3.8, 0.03% тетра-метил-бензидину (ТМВ), 0.02% перекису водню (H₂O₂) та 4% диметилсульфоксиду.

Примітка: Зберігати захищеним від світла, чутливий до сильного освітлення.

7. Сірчана кислота H₂SO₄ 0.3 M

1x15 мл (ml)/пляшка. Містить 0.3 M (M) розчину H₂SO₄. Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

8. Розчинник для зразків DILSPE

2x60.0 мл (ml)/флакон. Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратного буфера рН 6.0 +/- 0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

9. Уцільнювальна фольга для планшета x 2 шт.
10. Вкладиш інструкції x 1 шт.
Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000 мкл (µl), 100 мкл (µl) і 10 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, оброблена деревинним вугіллям, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.

- Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборами мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
- Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
- Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
- Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказує на будь-яку істотну втрату активності до шести використань пристрою та до 3 місяців.
- Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедицині лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
- Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
- Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
- Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

- Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
- Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
- Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
- Сироватку та плазму можна зберігати при +2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виб'яте з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) декілька місяців. Будь-які заморожені зразки не слід

заморожувати/розморозувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.

- Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.
- Зразки, у яких очікується, що концентрація антитіл IgG до Краснухи буде вищою за 250 МО/мл (IU/ml), перед використанням слід розбавити або 1:10, або 1:100 з Калібратором 0 МО/мл (IU/ml). Розведення слід проводити в чистих одноразових пробірках, розбавляючи 50 мкл (µl) кожного зразка з 450 мкл (µl) Cal 0 (1:10). Потім 50 мкл (µl) розведення 1:10 розбавляють з 450 мкл (µl) Cal 0 (1:100). Ретельно перемішайте вміст пробірки на вортексі, а потім перейдіть до етапу розведення, зазначеного в розділі М.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 використань пристрою та терміном до 3 місяців.

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів ЛАБЮЕІ. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при +2-8 °C (°C).

При першому відкритті смужки, що залишилися, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не перетвориться з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Контрольна сироватка:

Додайте до ліофілизованого порошку об'єм води класу ELISA, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: Контроль після розчинення не є стабільним. Зберігати замороженими в аликвотах при -20 °C (°C).

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням весь вміст 20х концентрованого розчину слід розбавити водою класу EIA і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2...8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент потрібно переносити, використовуйте лише пластикові, можливо, стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **Н-фрази**:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **Р-фрази**:

R280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

R302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

R332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

R305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

R337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

R362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій підходять як сухі інкубатори, так і водняні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл (μl)/лунку промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск ± 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (а) пропускання здатність ≤ 10 нм (nm); (б) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (с) лінійність до ≥ 2.0; (д) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, для того, щоб відповідати значенням, зазначеним у розділах «Валідація тесту» та «Робочі характеристики аналізу». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується, коли кількість зразків, що перевіряються, перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Служба підтримки клієнтів ЛАБЮЕІ пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що

використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці (коробка з набором). Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
5. Розчиніть вміст ліофілізованої Контрольної Сироватки, як зазначено у відповідному розділі.
6. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
7. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі компоненти.
8. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
9. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
10. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
11. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
12. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
13. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Набір також може бути використаний для кількісного та якісного визначення.

M.1 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Автоматизований аналіз:

Якщо тест проводиться автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо, щоб прилад аспірував 1000 мкл (μl) Розчинника для зразків, а потім 10 мкл (μl) зразка (коефіцієнт розведення 1:101). Потім весь вміст вносять у правильно визначену пробірку для розведення. Перед аспірацією наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення зразків. Коли всі зразки будуть розбавлені, переконайтеся, що прилад вносить 100 мкл (μl) розведених зразків у відповідні лунки мікропланшета. Цю процедуру також можна проводити у два етапи розведення по 1:10 кожен (90 мкл (μl) Розчинника для зразків + 10 мкл (μl) зразка) у другу платформу для розведення. Потім переконайтеся, що прилад аспірує спочатку 100 мкл (μl) Розчинника для зразків, потім 10 мкл (μl) рідини з першого розведення на платформі і, нарешті, розподіліть весь вміст у відповідну лунку мікропланшета. Не розбавляйте Калібратори та розчинену Контрольну Сироватку, оскільки вони готові до використання. Розподіліть 100 мкл (μl) калібраторів/контролю у відповідні калібрувальні/контрольні лунки. Для наступних операцій дотримуйтеся інструкцій з експлуатації, наведених нижче для Ручного аналізу. Настійно рекомендується перевірити, що проміжок часу між внесенням першого та останнього зразків буде розрахований приладом та врахований шляхом відповідної затримки першої операції промивання.

Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101 у відповідно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника для зразків + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Набір для калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.

2. Помістіть необхідну кількість лунок у тримач мікролунок. Залиште 1-у та 2-у лунки (позиції A1 і B1 мікропланшета) порожніми для операції бланкування.
3. Розподіліть 100 мкл (μl) Калібраторів та 100 мкл (μl) Контрольної Сироватки в дублях. Внесіть 100 мкл (μl) розведених 1:101 зразків у відповідну лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки слід герметизувати клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як зазначено у розділі І.3.
6. Піпетуйте 100 мкл (ml) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, крім 1-ї та 2-ї лунок для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору розподілений у всіх лунках, крім A1 та B1.

Важливі примітки:

1. *Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунки наконечником піпетки, заповненим Ферментним Кон'югатом. Можливе забруднення.*
2. *Ретельно перемішайте Ферментний Кон'югат на вортексі перед його використанням!!!*
7. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.
8. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 5.
9. Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунки A1+B1. Потім інкубуйте мікропланшет протягом **20 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °C (°C))**.

Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може створюватися високий фон.

10. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 9, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю та позитивних зразків з блакитного на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці A1 або B1 або в обидвох.

М2. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо потрібно лише якісне визначення, виконайте дії, описані нижче:

Автоматизований аналіз:

Дійте, як описано в розділі M1.

Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101 у відповідно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника для зразків + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Набір для калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість лунок у тримач мікролунок. Залиште 1-у лунку (позиція A1) порожньою для операції бланкування.
3. Розподіліть 100 мкл (μl) Калібратора 0 МО/мл (IU/ml) та 100 мкл (μl) Калібратора 50 МО/мл (IU/ml) в дублях, і 100 мкл (μl) Калібратора 1000 МО/мл (IU/ml) в одному екземплярі. Внесіть 100 мкл (μl) розведених 1:101 зразків в кожну відповідно визначену лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки слід герметизувати клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, подавши та аспіруючи 350 мкл (μl)/лунку розведеного промивного розчину, як зазначено у розділі І.3.
6. Піпетуйте 100 мкл (ml) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, крім 1-ї лунок для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору розподілений у всіх лунках, крім 1-ї лунок для бланкування.

Важливі примітки:

- *Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунки наконечником піпетки, заповненим Ферментним Кон'югатом. Можливе забруднення.*
 - *Ретельно перемішайте Ферментний Кон'югат на вортексі перед його використанням!!!*
7. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.
 8. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 5.
 9. Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунку. Потім інкубуйте мікропланшет протягом **20 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °C (°C))**.

Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може створюватися високий фон.

10. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 9, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю та позитивних зразків з блакитного на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці A1.

Важливі зауваження:

1. *Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.*
2. *Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.*
3. *Контрольна Сироватка (CS) не впливає на розрахунок результатів випробувань. Калібратор можна використовувати лише тоді, коли керівництво лабораторії вимагає внутрішнього контролю якості.*

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори та Контроль	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
TMB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хв.
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми видачі для Кількісного аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1										
B	BLK	CAL4	S2										
C	CAL1	CAL5	S3										
D	CAL1	CAL5	S4										
E	CAL2	CAL6	S5										
F	CAL2	CAL6	S6										
G	CAL3	CS	S7										
H	CAL3	CS	S8										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор CS = Контрольна Сироватка S = Зразок

Нижче наведено приклад схеми видачі для Якісного аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11										
B	CAL1	S4	S12										
C	CAL1	S5	S13										
D	CAL2	S6	S14										
E	CAL2	S7	S15										
F	CAL6	S8	S16										
G	S1	S9	S17										
H	S2	S10	S18										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор CS = Контрольна Сироватка S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Будь-коли, коли використовується набір, виконується контроль, щоб перевірити, чи відповідають заявленим характеристики аналізу та як вимагається Директивою IVDD 98/79/ЄС. Перевірте відповідність наступних даних:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення OD 450 нм (nm)
Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (CAL1)	< 0.150 Середнього значення OD 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
Калібратор 50 МО/мл (IU/ml)	OD 450 нм (nm) > OD 450 нм (nm) CAL1 + 0.100
Калібратор 1000 МО/мл (IU/ml)	OD 450 нм (nm) > 1.000
Контрольна Сироватка	250 МО/мл (IU/ml) BOO3 ± 10%

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу. Якщо це не так, не продовжуйте і виконайте наступні перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100 OD 450 нм (nm)	1. що під час аналізу розчин Хромоген/Субстрат не забруднився.
Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) > 0.150 OD 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації > 30%	1. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний належний миючий розчин і перед використанням вошер був ним праймований; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки (внесення позитивного калібратора замість негативного); 4. що не відбулося жодного забруднення негативного калібратора або його лунки через позитивні зразки, розливи або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. що голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Калібратор 50 МО/мл (IU/ml) OD 450 нм (nm) < OD 450 нм (nm) CAL1 + 0.100	1. що процедура була правильно виконана; 2. що при внесенні не було зроблено жодної помилки (напр.: внесено неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що зовнішнє забруднення калібратора не відбулося.
Калібратор 1000 МО/мл (IU/ml) < 1.000 OD 450 нм (nm)	1. що процедура була правильно виконана; 2. що при внесенні не було зроблено жодної помилки (напр.: внесено неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні;

	4. що зовнішнє забруднення калібратора не відбулося.
Контрольна сироватка Відрізняється від очікуваного значення	Спочатку переконайтесь, що: 1. що процедура була правильно виконана; 2. що жодна помилка не сталася під час внесення (наприклад, внесення неправильного зразка); 3. що процедура промивання та налаштування вошера коректні; 4. що не відбулося зовнішнє забруднення стандарту. 5. Контрольна сироватка була розчинена з відповідним об'ємом, зазначеним на етикетці. Якщо було виявлено помилку, аналіз слід повторити після усунення причини цієї помилки. Якщо помилки не виявлено, виконайте наведені нижче дії. a) отримано значення до +/- 20%: загальна Точність лабораторії може не дозволити тесту відповідати очікуваному значенню +/- 10%. Повідомте про проблему керівнику для прийняття або відхилення цього результату. b) отримано значення, що перевищує +/- 20%: у цьому випадку тест є недійсним, і необхідно викликати службу підтримки ЛАБЮЕЙ.

Якщо виникла якась із зазначених вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, як і на етапі читання, описаному в розділі М, пункт 11.

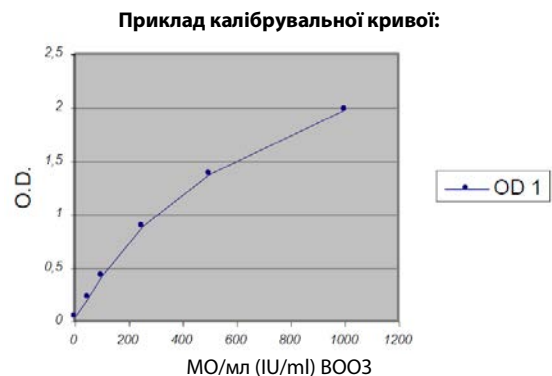
Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Р.1 Кількісний метод

Якщо випробування виявилось дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму підбору кривих, щоб побудувати калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами).

Потім на калібрувальній кривій обчисліть концентрацію антитіл IgG проти T.gondii у зразках.

Приклад кривої калібрування наведено нижче.



Важлива примітка:

Не використовуйте калібрувальну криву, наведену вище, для розрахунків.

Р.2 Якісний метод

У якісному методі обчисліть середні значення OD 450 нм (nm) для Калібраторів 0 і 50 МО/мл (IU/ml), а потім перевірте, чи аналіз є дійсним.

Приклад розрахунку наведено нижче (дані, отримані на етапі читання, описаному в розділі М, пункт 11).

Наведені нижче дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml):	0.020 - 0.024 OD 450 нм (nm)
Середнє значення:	0.022 OD 450 нм (nm)
Нижче	0.150 - прийнято
Калібратор 50 МО/мл (IU/ml):	0.250 - 0.270 OD 450 нм (nm)

Середнє значення:	0.260 OD 450 нм (nm)
Вище, ніж	Cal 0 + 0.100 - Прийнято
Калібратор 1000 МО/мл (IU/ml):	2.845 OD 450 нм (nm)
Вище	1000 - прийнято

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Особливу увагу при інтерпретації результатів слід приділяти при подальшому спостереженні за вагітністю з приводу інфекції *Toxoplasma gondii* через ризик важких вад розвитку новонароджених.

Значення cut-off приладу встановлено на рівні 50 МО/мл (IU/ml), і не нижче, ніж для деяких інших пристроїв, що наявні на ринку, для забезпечення найвищої діагностичної цінності тесту, зокрема, коли аналіз застосовується під час моніторингу вагітності.

Фактично, після інфікування, у пацієнта з першого разу після сероконверсії розвивається сильна імунологічна відповідь на *Toxoplasma gondii*, що значно перевищує 50 МО/мл (IU/ml).

Антитіла з низьким титром (нижче 50 МО/мл (IU/ml)) здебільшого демонструють низький авідитет до інфекційного агента і можуть являти собою діагностичний маркер недавньої інфекції у поєднанні з IgM.

Вагітні жінки з концентрацією антитіл нижче 50 МО/мл (IU/ml) вважаються негативними, щоб клініцист вважав їх пацієнтами «ризик» та відстежував їх як на IgG, так і на IgM під час вагітності.

Зразки з концентрацією, що перевищує 50 МО/мл (IU/ml) ВООЗ, вважаються позитивними щодо антитіл до IgG проти *Toxoplasma gondii*, безперечно здатних забезпечити імунітет проти інфекції.

Цей титр вважається NCCLS, США найнижчою концентрацією IgG для забезпечення ефективного імунологічного захисту від другої інфекції *Toxoplasma gondii*.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Коли результати тесту передаються з лабораторії до іншого закладу, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Під час спостереження за вагітністю з приводу інфекції *T.gondii* слід підтвердити позитивний результат (наявність антитіл IgG > 50 МО/мл (IU/ml)), щоб виключити ризик хибнопозитивного результату та хибного визначення захисту.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності була проведена відповідно до того, що зазначено у стандарті prEN 13612.

1. Межа виявлення

Межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою 3-го міжнародного стандарту ВООЗ.

Межа виявлення була розрахована як середнє OD 450 нм (nm) Калібратора 0 МО/мл (IU/ml) + 5 SD.

У таблиці нижче наведено середні значення OD450 нм (nm) цього стандарту при розведенні в негативній плазмі, а потім досліджено в аналізі в трьох лотах.

ВООЗ МО/мл (IU/ml)	LUA-TOXOG.CE Лот 0503	LUA-TOXOG.CE Лот 0403	LUA-TOXOG.CE Лот 0303
250	0.816	0.853	0.974
100	0.365	0.398	0.445
50	0.209	0.244	0.246
10	0.094	0.125	0.108
Стандарт 0	0.033	0.031	0.056

Аналіз показує межу виявлення краще, ніж 10 МО/мл (IU/ml).

2. Діагностична чутливість

Діагностична чутливість була випробувана у дослідженні Оцінки Продуктивності на панелях зразків, класифікованих позитивними з набором, схваленим FDA США. Тестували позитивні зразки з різних стадій зараження вірусом *Toxoplasma gondii*.

Значення, отримане з аналізу більш ніж 300 зразків, становить > 98%.

3. Діагностична специфічність

Діагностична специфічність була визначена на панелях негативних зразків від неінфікованих осіб, класифікованих як негативні з набором, схваленим FDA США.

Для визначення значення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів підготовки (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки.

Заморожені зразки також були протестовані для перевірки на наявність інтерференцій через збір та зберігання.

Інтерференції не спостерігалося.

Тестувались потенційно інтерферуючі зразки, отримані від пацієнтів з різними патологіями (переважно ANA, AMA та RF позитивні) та від вагітних жінок. Перехресної реакції не спостерігалося.

Загальне значення специфічності > 98% було виявлено при дослідженні більш ніж 100 зразків.

4. Точність

Було розраховано на трьох Калібраторах, досліджених у 16 повторях у трьох окремих пробігах в трьох лотах. Результати повідомляються наступним чином:

LUA-TOXOG.CE: Лот 0503

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.067	0.066	0.070	0.067
Стандартне відхилення	0.006	0.005	0.006	0.006
CV %	9.3	7.7	9.0	8.7

Калібратор 50 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.276	0.259	0.268	0.267
Стандартне відхилення	0.025	0.006	0.010	0.014
CV %	9.1	2.4	3.6	5.0

Калібратор 1000 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	2.768	2.657	2.707	2.711
Стандартне відхилення	0.118	0.098	0.101	0.106
CV %	4.3	3.7	3.7	3.9

LUA-TOXO.CE: Лот 0403

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.067	0.065	0.068	0.066
Стандартне відхилення	0.003	0.004	0.006	0.004
CV %	5.2	6.3	8.3	6.6

Калібратор 50 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.270	0.262	0.265	0.265
Стандартне відхилення	0.012	0.009	0.008	0.010
CV %	4.5	3.4	3.1	3.7

Калібратор 1000 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	2.765	2.652	2.718	2.712
Стандартне відхилення	0.115	0.101	0.092	0.103
CV %	4.2	3.8	3.4	3.8

LUA-TOXOG.CE: Лот 0303

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.068	0.067	0.069	0.068
Стандартне відхилення	0.004	0.004	0.006	0.004
CV %	5.1	6.1	8.0	6.4

Калібратор 50 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.268	0.261	0.265	0.265
Стандартне відхилення	0.012	0.009	0.008	0.010
CV %	4.6	3.3	3.2	3.7

Калібратор 1000 МО/мл (IU/ml) (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	2.766	2.651	2.719	2.712
Стандартне відхилення	0.115	0.100	0.091	0.102
CV %	4.2	3.8	3.3	3.8

Змінність, наведена у таблицях вище, не призвела до неправильної класифікації зразків.

5. Достовірність

Достовірність аналізу перевіряли тестами на розведення та відновлення. Будь-який «хук-ефект», недооцінка якого, ймовірно, відбудеться при застосуванні високих доз аналіту, був виключений до 4000 МО/мл (IU/ml).

5. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Бактеріальне забруднення або інактивація зразка теплом можуть вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати, можуть дати хибні результати.

Цей тест підходить тільки для випробування одиночних зразків, а не пулованих.

Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на основі єдиного результату тесту. Слід враховувати історію хвороби пацієнта, симптоматику та інші діагностичні дані.

Важлива примітка:

Дані про продуктивність були отримані на етапі читання, описаному в розділі M, пункт 11.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.

**ВИРОБНИК:**

ТОВ «ЛАБЮЕЙ»

Україна, 76018

м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25

Моб.: +38 (067) 000-20-22

E-mail: info@labua.com.ua

UA.TR.116