



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА
РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ВОЗБУДИТЕЛЮ ТОКСОПЛАЗМОЗА
ЧЕЛОВЕКА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ИФА-Токсо-IgG**

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
28.05.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для количественного анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител класса IgG к *T.gondii* методом иммуноферментного анализа.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Общая характеристика

Токсоплазмоз – протозойное заболевание, возбудителем которого является облигатный внутриклеточный паразит *Toxoplasma gondii*. Заражение токсоплазмой происходит при употреблении в пищу термически недостаточно обработанных мясopодуKтов, пораженных цистами токсоплазм. Возможна также трансплантационная передача токсоплазм – при пересадке органов инфицированных доноров, и конгенитальная – при внутриутробном заражении плода от матери через плаценту. Инфицирование в первом триместре беременности приводит к замиpанию и абортированию плода. В подавляющем большинстве случаев токсоплазмоз протекает бессимптомно, что усложняет его клиническую диагностику. В настоящее время для серодиагностики токсоплазменной инфекции широко используется метод иммуноферментного анализа. При первичном инфицировании IgG антитела к *T.gondii* появляются в крови через 1-2 месяца и сохраняются на протяжении всей жизни, при рецидивах заболевания их уровень резко повышается.

2.2. Состав набора:

| № | Наименование компонента | Количество |
|----|--|----------------------|
| 1 | Иммуносорбент | 1 шт |
| 2 | Конъюгат | 1 микропроб.; 1,5 мл |
| 3 | Отрицательная контрольная сыворотка (0 МЕ/мл) (K) | 1 микропроб.; 0,2 мл |
| 4 | Положительная контрольная сыворотка 1 (20 МЕ/мл) (K ₁ ⁺) | 1 микропроб., 0,2 мл |
| 5 | Положительная контрольная сыворотка 2 (100 МЕ/мл) (K ₂ ⁺) | 1 микропроб., 0,2 мл |
| 6 | Концентрат раствора для промывания планшетов (КРП) | 2 флакона, 25мл |
| 7 | Раствор для разведения сывороток (РРС) | 2 флакона, 30мл |
| 8 | Раствор для разведения конъюгата (РПК) | 1 флакон, 15мл |
| 9 | Субстратный буферный раствор (СБР) | 1 флакон, 8мл |
| 10 | Раствор 3,3,5,5 - тетраметилбензидина (ТМБ) | 1 флакон, 8мл |
| 11 | Стоп-реагент | 1 флакон, 15мл |
| 12 | Клейкая пленка | 3 шт. |

Принцип анализа ИФА-Тохо-IgG базируется на методе твердофазного непрямого ИФА. При внесении в лунки образцов исследуемых сывороток антитела класса IgG к *T.gondii*, в случае их наличия, связываются с антигенами *T.gondii*, сорбированными на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи пероксидазного конъюгата моноклональных антител к иммуноглобулинам класса IgG человека. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют субстратный буфер (перекись водорода) и раствор ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации специфических IgG антител к *T.gondii* в образцах сывороток или плазмы крови.

Концентрация антител класса IgG к *T.gondii* может быть выражена в Международных единицах (МЕ) с использованием калибровочной кривой. Положительные контроли, используемые для построения кривой, оттитрованы относительно 3-го Международного стандарта ВОЗ – Anti-Toxo-plasma serum, Human TOXM, (NIBSC).

2.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Рекombинантные антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях *E.coli* и содержащиеся в наборе "ИФА-Тохо-IgG" являются биологически безопасными. Однако работа со всеми

исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4. ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранить при температуре (2-8) °C в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °C) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

**5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
 - пипетки одноканальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,010 до 5,0 мл (от 10 до 5000 мкл);
 - пипетки 8-ми канальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 до 0,30 мл (от 10 до 300 мкл);
 - суховоздушный термостат настроенный на температуру 37 °C;
 - мерные цилиндры вместимостью 100 и 1000 мл;
 - стаканы мерные вместимостью 200 мл и 2000 мл;
 - ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
 - флаконы стеклянные вместимостью 5 мл и 20 мл;
 - клейкая пленка или крышка;
 - бумага фильтровальная;
 - перчатки резиновые хирургические;
 - вода дистиллированная;
 - контейнер для сбора твердых отходов;
 - контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 96 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °C в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета
Если КРП содержит кристаллы, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37) °C до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 48 мл концентрата в мерный стаканмести-

мостью 2000 мл, добавить 1448 мл дистиллированной воды и перемешать раствор стеклянной палочкой в течении (40-60) с.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 10 суток.

6.3 Приготовление раствора конъюгата

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 10 мл РРК, добавить 1 мл конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

6.4 Приготовление ТМБ-субстратного раствора

ВНИМАНИЕ! ТМБ-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 6 мл СБР, добавить 6 мл раствора ТМБ и интенсивно перемешать смесь в течение (20-30) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием ТМБ-субстратный раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором проявителя, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники

6.5 Разведение сывороток (образцов и контролей)

Исследуемые образцы сывороток, отрицательные и положительные контрольные сыворотки необходимо развести в соотношении 1:51 раствором для разведения сывороток, к 500 мкл РРС добавить 10 мкл сыворотки или контроля.

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- полностью удалить раствор из лунок.

- на поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Иммуносорбент освободить от упаковочного пакета.

8.2 Приготовить раствор для промывания планшета (п.6.2) и раствор конъюгата (п.6.3).

8.3 Внести предварительно разведенные по п. 6.5 исследуемые и контрольные сыворотки:

- в лунку А1 – 0,1 мл (К₁),

- в лунку В1 – 0,1 мл (К₁⁺),

- в лунку С1 – 0,1 мл (К₂⁺),

- в остальные лунки – по 0,1 мл исследуемых сывороток

8.4 Накрывать планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать при температуре (37±2) °С в течение 60 минут.

8.5 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 4 раза раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п.7).

8.6 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата .

8.7 Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25)°С в течение 30 мин.

8.8 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 6 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п.7).

8.9 Приготовить ТМБ-субстратный раствор (п.6.4).

8.10 Внести в лунки планшета по 0,1 мл раствора ТМБ-субстрата. Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25)°С в защищенном от света месте в течение 30 мин.

8.11 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности внесения, что и ТМБ-субстратный раствор).

8.12 Не позже чем через 5 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Оптическую плотность можно измерять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий:

- ОП (К), не должно превышать 0,2 ОЕ;

- ОП (К₁⁺) должно быть не ниже 0,2 ОЕ;

- ОП (К₂⁺) должно быть не ниже 1,0 ОЕ.

9.2 Концентрация IgG антител к T.gondii в образце может быть выражена в Международных единицах (МЕ). Для получения количественного результата в МЕ/мл следует построить калибровочную кривую. Для этого следует отложить по оси Y значения ОП контрольных сывороток: отрицательной и двух положительных (I и II), а на оси X соответствующие им концентрации – 0, 20, 100 МЕ/мл.

9.3 Используя построенную кривую, определить концентрацию IgG в МЕ/мл для каждого исследуемого образца согласно полученному значению оптической плотности.

Если ОП исследуемого образца в разведении 1:51 больше 3,0 ОЕ, рекомендуется исследовать эту сыворотку в разведении 1:510. При расчете концентрации IgG этого образца в МЕ/мл умножить полученное значение на 10.

Для автоматического учета результатов анализов могут использоваться соответствующие компьютерные программы.

9.4 Результат каждого анализа оценивают следующим образом:

| | |
|---------------|----------------|
| > 20 МЕ/мл | положительный |
| 18 – 20 МЕ/мл | неопределенный |
| < 18 МЕ/мл | отрицательный |

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Позитивный результат на IgG антитела к T.gondii указывает на вялотекущую инфекцию или заболевание в прошлом, в результате которого сформировался постинфекционный иммунитет. Специфические IgG к T.gondii могут выявляться в организме в течение всей жизни.

При острой инфекции отмечается наличие в сыворотке крови специфических антител класса IgM, которые появляются через несколько дней от момента заражения токсоплазмой и могут в определенных случаях персистировать в организме до 1 года. Антитела класса IgG к T.gondii появляются на неделю позднее, чем IgM и их титр при острой инфекции постепенно увеличивается. Четырехкратное увеличение количества специфических IgG антител в парных сыворотках крови, взятых от больного с интервалом в 2-3 недели, которые необходимо тестировать одновременно в одной постановке ИФА, является важным показателем острого периода заболевания.

Отрицательный результат на IgG и IgM антитела к T.gondii свидетельствует об отсутствии возбудителя в организме и восприимчивости человека к первичной инфекции. Беременные женщины с таким результатом попадают в группу риска и должны обследоваться каждый триместр на наличие IgG и IgM антител к T.gondii.

Если образец снова диагностируется неопределенным, это может свидетельствовать о начале заболевания. В этом случае рекомендуется провести диагностику на специфические антитела класса IgG, анализируя уровень антител в парных сыворотках в одной постановке ИФА.

У новорожденных материнские IgG антитела к T.gondii могут персистировать в течение 6 месяцев. Отсутствие специфических IgG антител у новорожденных дает основание исключить конгенитальное заражение токсоплазмозом.

11 ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

11.1 Для постановки окончательного диагноза следует учитывать не только результаты серологического теста, но и клиническую картину заболевания.

Отрицательный результат тестирования на специфические антитела IgG и IgM классов к T.gondii может регистрироваться в период сероконверсионного окна, который составляет 2-3 недели от начала инфицирования.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

12.2 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

12.3 Срок годности набора – 1 год.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ № 351 от 16.12.98 г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85 Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы