



**Vitrotest**<sup>®</sup>

# Vitrotest Trichomonas-IgG

Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgG до *Trichomonas vaginalis*

## Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK061

## «Vitrotest Trichomonas-IgG»

### Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgG до *Trichomonas vaginalis*

#### 1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Trichomonas-IgG» призначена для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgG до *Trichomonas vaginalis* у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

#### 2. Клінічне значення

Джгутиковий найпростіший одноклітинний паразит *Trichomonas vaginalis* являється етіологічним агентом одного з найбільш поширених у світі захворювань, що передається статевим шляхом. В середньому 25% людей, які ведуть активне статеве життя, інфіковані *T.vaginalis*. За останніми даними щорічно в світі трапляється більш як 170 мільйонів випадків трихомоніазу.

У жінок трихомонади призводять до гострого та підгострого вагітиту, симптомами якого бувають пінисті виділення, свербіж і болі внизу живота. Захворювання має циклічний характер – згадані симптоми згасають при менструація та вагітності. Під час вагітності, трихомоніаз може призвести до передчасних пологів та народження дітей з низькою вагою. У чоловіків *T.vaginalis* зазвичай викликає уретрит, простатит, епідиміт, а також дизурічні розлади. У більшості випадків захворювання протікає безсимптомно. Стерті симптоми захворювання у чоловіків пояснюють вимиванням значної частини трихомонад із уrogenітального тракту при сечовипусканні. Латентний перебіг захворювання часто призводить до недооцінки поширення інфекції. Наслідком хронічної інфекції майже завжди стає хронічний простатит. Трихомоніаз також пов'язують з розвитком раку простати у чоловіків.

На даний час для діагностики трихомоніазу застосовують наступні лабораторні методи:

- мікроскопія вагінального або цервікального секретів у жінок, та виділень сечовивідного каналу у чоловіків;
- виділення трихомонад в культурі;
- виявлення ДНК збудника шляхом полімеразної ланцюгової реакції;
- виявлення специфічних до *T.vaginalis* антитіл методом імуноферментного аналізу.

За даними ряду досліджень чутливість методів прямої детекції паразита знаходиться в межах 38-82%. В той же відомо, що у інфікованих осіб розвивається гуморальна, секреторна та клітинна імунна відповідь на паразита, це дозволяє використовувати серологічні дослідження в діагностичних цілях. Антитіла до поверхневого антигену р270 та  $\alpha$ -актинину трихомонад продукуються майже в усіх інфікованих осіб, а рівні сироваткових антитіл корелюють з активною формою інфекції. Особливого значення набувають методи серологічної діагностики у інфікованих осіб, які не мають клінічних проявів трихомоніазу та чоловіків, які можуть бути безсимптомними носіями паразитів.

#### 3. Принцип аналізу

Визначення антитіл до *Trichomonas vaginalis* в тест-системі «Vitrotest Trichomonas-IgG» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованим в лунках рекомбінантним антигеном *Trichomonas vaginalis*. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до *Trichomonas vaginalis* антитіл з антигеном на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат антивидових (специфічних до антитіл класу IgG) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імунні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

#### 4. Матеріали та обладнання

##### 4.1 Склад набору

**ІФА-планшет** – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованим антигеном *Trichomonas vaginalis*.

**Позитивний контроль** – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину специфічних імуноглобулінів, специфічних до *Trichomonas vaginalis* (рожевий).

**Негативний контроль** – 1 мікропробірка, що містить 1,0 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

**Розчин для розведення сироваток РРС** – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (коричнево-зелений).

**Розчин кон'югату РК** – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину моноклональних антитіл до IgG людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (зелений). Готовий до використання.

**Розчин ТМБ** – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

**Розчин для промивання Tw20 (20x)** – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Твіном-20 (безбарвний).

**Стоп-реагент** – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

**Клейка плівка** – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

**Бланк внесення проб** – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

**Інструкція** – 1 екземпляр інструкції з використання

#### 4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- <sup>1</sup>автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- <sup>2</sup>одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

<sup>1,2</sup>Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.

## 5. Застереження та техніка безпеки

### 5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення терміну придатності;  
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

*Примітка:* Допускається використання Розчину для промивання Tw20 (20x), Розчину ТМБ та Стоп-реагенту інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

– після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

– чітко дотримуйтеся режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

– під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

– кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

– уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;

– розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

– для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;

– ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

### 5.2. Техніка безпеки:

– всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;

– постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

– не піпетувати розчини ротом;

– у контролях тест-системи «Vitrotest Trichomonas-IgG» не виявлено HBsAg та антитіл до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак, працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, чи іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклауйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризування розчинів, що не містять кислоти (наприклад, сироваток), обробити поверхню 6%-м розчином перекису водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

## **6. Зберігання та стабільність**

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, за умови їх зберігання при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

## **7. Підготовка зразків**

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

## **8. Підготовка реагентів**

*Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Trichomonas-IgG» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.*

### **8.1. Підготовка ІФА-планшета**

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

### **8.2. Розчин для промивання**

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

## **9. Процедура аналізу**

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. В лунки стрипів внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки по 20 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль, в решту лунок – досліджувані сироватки. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.13. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в одновхвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

## 10. Облік результатів та їх інтерпретація

### 10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{- \text{середнє}} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 0,8 оптичних одиниць (ОО),
- ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.
- оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{- \text{середнє}} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{- \text{середнє}} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

### 10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати, додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,3, тобто

$$\text{Граничне значення} = ОГ K_{- \text{середнє}} + 0,3.$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{Граничне значення}}.$$

### 10.3. Інтерпретація результатів

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище 1,1** вважати **позитивними** (ІП > 1,1).

Зразки із значенням ІП **нижче 0,9** вважати **негативними** (ІП < 0,9).

Зразки із значенням ІП **в межах 0,9-1,1** вважати **невизначеними** (0,9 ≤ ІП ≤ 1,1). Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених, слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. У разі одержання невизначених результатів вважати, що сироватка не містить специфічних до *Trichomonas vaginalis* антитіл.

Використання індексу позитивності дозволяє проводити напівкількісний порівняльний аналіз рівня специфічних антитіл в парних сироватках крові. ІП в межах 1,1 – 7,0 пропорційний вмісту специфічних антитіл класу IgG. Це дозволяє проводити порівняльне дослідження парних сироваток, отриманих від пацієнтів з інтервалом у 2-4 тижні. Якщо ІП зразка становить вище 7,0 для коректної оцінки вмісту специфічних антитіл, рекомендується провести повторний аналіз зразка попередньо розведеного у 10 разів розчином для розведення сироваток. При визначенні індексу позитивності в такому разі слід перемножити отримане значення ІП на 10. Такий спосіб інтерпретації результатів аналізу дозволяє визначити рівень специфічних антитіл до *Trichomonas vaginalis* в динаміці.

## 11. Діагностичні характеристики тесту

### 11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість тест-системи «Vitrotest Trichomonas-IgG» оцінювали за допомогою панелі охарактеризованих сироваток, що складається з 28 зразків сироваток крові людини, що містять антитіла до *Trichomonas vaginalis* (сироватки були попередньо перевірені в двох інших комерційних тестах для виявлення антитіл класу IgG до *Trichomonas vaginalis*). В тест-системі «Vitrotest Trichomonas-IgG» 28 сироваток були визначені позитивними. При дослідженні 98 негативних на антитіла до *Trichomonas vaginalis* сироваток показник специфічності становив більше 97%.

## 12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Trichomonas-IgG» є свідченням наявності у пацієнта антитіл, специфічних до *Trichomonas vaginalis*. Антитіла цього класу виявляються при наявній або перенесеній інфекції.

Слід зауважити, що у випадку ранньої трихомонадної інфекції результат ІФА може бути негативний через відсутність антитіл на початковій стадії хвороби. При наявності клінічних проявів захворювання рекомендується провести повторне тестування не менш ніж через два тижні.

Негативний результат у тест-системі «Vitrotest Trichomonas-IgG» свідчить про відсутність у сироватці крові обстежуваної людини антитіл, специфічних до *Trichomonas vaginalis*, або концентрація специфічних антитіл нижче межі чутливості аналізу.

Для визначення остаточного діагнозу слід враховувати результати серологічного тесту, комплексу інших лабораторних досліджень, а також клінічні прояви захворювання.

### **Література**

1. Возбудители протозойных инфекций человека // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К.Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 942-986.

2. Руководство по инфекционным болезням с атласом инфекционной патологии. Под редакцией Ю.В. Лобзина, С.С. Козлова, А.Н. Ускова. – СПб, 2000.

3. Addis M.F., Rappelli P., Andrade A.M.P et.al. Identification of *Trichomonas vaginalis*  $\alpha$ -actinin as the most common immunogen recognized by sera of women exposed to the parasite. // J. of Inf. Des.. – 1999. – V. 180. – P. 1727-1730.

4. Don C. Dailey, Alderete J.F. The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single? tandemly repeated immunodominant epitope // Inf. and Immun. - 1991. – Vol.59, No.6 – p.2083–2088.

5. Musatovova O., Alderete J.F. The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying p270 immunogen is highly conserved for numbers of repeated elements // Microbiol. Pathog. – 1999. – Vol.27, No.2 – p.93-104.

6. Petrin D., Delgaty K., Bhatt R. et.al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis* // Clin. Microbiol. Reviews – 1998. – Vol.11, No.2 – p.300-317.

7. Sutcliffe S., Giovannucci E., Alderete J.F. et.al. Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. - 2006. – N.15 – p.939–945.



## Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»  
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)  
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)  
тел. +380 44 222-76-72

## Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest Trichomonas-IgG»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *TW20* очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 20 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль,

B1, C1, D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

*Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій*

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest Trichomonas-IgG» за формулою:

$$ГЗ = ОГ К - середнє + 0,3$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:  $ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення ІП	Результат
$ІП_{\text{зразка}} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{\text{зразка}} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{\text{зразка}} < 0,9$	негативний