



## Токсоплазма гондии IgG

Кат. Номер : 3519  
Количество : 96  
Производитель : DRG (Германия)

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

Методика от 02-2008

### 1. Введение

Иммуноферментный анализ для качественного и количественного определения антител класса IgG вирусу *Toxoplasma gondii* в сыворотке человека.

### 2. Принцип анализа

Набор **ТОХОПЛАЗМА GONDII IgG ELISA** - это набор для определения антител класса IgG в сыворотке человека.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами Токсоплазмы Гондии. **Разведенные** образцы пациента и **готовые к использованию** стандарты и контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к токсоплазме гондии антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgG, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается только с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфичных к токсоплазме гондии. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

### 3. Предостережения

- Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.
- За более полной информацией об опасных веществах, входящих в состав набора, обращайтесь к паспорту безопасности данных для данного набора.
- Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы и определены как отрицательные для HIV I/II, HBsAg и HCV. Однако, все реагенты необходимо рассматривать как потенциальную биологическую угрозу.
- Избегать контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
- Не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курить, не пить, не использовать косметику во время работы с образцами и реагентами набора.
- Проводить анализ рекомендуется в одноразовых перчатках. Попадание инфекции в реагенты и образцы может привести к ошибочным результатам.
- Соблюдайте меры предосторожности. Анализ необходимо проводить в соответствии с правилами национальной биологической безопасности.
- Обращайте внимание на номер лота и срок хранения.
- Все указанные значения необходимо выполнять в соответствии с инструкцией набора. Наиболее оптимальных результатов анализа можно достичь путем использования градуированных пипеток.
- Не используйте реагенты из разных наборов. Рекомендуется не смешивать лунки различных планшет даже из одного лота. Наборы хранились в различных условиях во время транспортировки, поэтому характеристики связывания планшет могут показать различный результаты.
- В соответствии с правилами национальной безопасности, с химическими продуктами и использованными для анализа реагентами необходимо обращаться как с опасными веществами.
- Паспорт безопасности данных для данного продукта имеется в наличии в DRG Instruments GmbH.
- Паспорт безопасности данных соответствует требованиям: EU-Guideline 91/155 EC.

### 4. Компоненты набора

#### 4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные стрипы** Токсоплазмы Гондии (IgG) 8-луночные делимые стрипы покрытые антигенами Токсоплазмы гондии + 1 держатель и 1 пленка для накрывания.

2. **Раствор для разведения образцов**\*\*\*, 100 мл готов к употреб., желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.

3. **Стандарты (1-4)**\*\*\*, 4 флакона

2	мл	стандарт А	20 МЕ/мл зеленый колп.
2	мл	стандарт В	50 МЕ/мл синий колп.
2	мл	стандарт С	100 МЕ/мл белый колп.
2	мл	стандарт D	200 МЕ/мл красный колп.

4. **Отрицательный контроль**\*\*\*, 2 мл готов к исполъз., желтого цвета, желтый колпачок.

5. **Положительный контроль**\*\*\*, 1 мл готов к исполъз., желтого цвета, красный колпачок.

6. **Ферментный конъюгат**\*\*, 20 мл готов к употреб., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные пероксидазой хрена.

7. **Раствор субстрата**, 14 мл готов к исполъз., ТМБ.

8. **Стоп-раствор**, 14 мл готов к исполъз., содержит 0,5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### Предупреждение

**Серная к-та раздражает глаза и кожу.**

9. **Промывочный раствор**\*, 30 мл концентрация 20x на 600 мл; pH 7.2 ± 0.2. см. „Подготовка реагентов“.

\* ⇒ содержит 0.3 % ProClin 300

\*\* ⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата

\*\*\* ⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.015 % 5-bromo-5-nitro-1.3-dioxane (BND) + 0.010 % 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT).

#### 4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

1. Микротитровальный планшетный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
2. Калибровочные микропипетки разного объема.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Вortexный трубчатый миксер.
6. Таймер.
7. Абсорбирующая бумага.

#### 4.2 Хранение и стабильность набора

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2 - 8 °С.

**Не использовать реагенты после окончания срока годности!**

#### 4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество стрипов к комнатной температуре.

##### Промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистилированной водой. потребление: **~5 мл** на определение

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °С на водянойбане. стабильность после разведения: 4 недели при 2 + 8 °С

#### 4.4 Утилизация набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в оригинале инструкции).

#### 4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуются тестировать поврежденные наборы.

### 5. Образцы

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемичиские образцы.

#### 5.1 Забор образцов

##### Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре.

#### 5.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы должны храниться накрытыми в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

#### 5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения (**хорошо смешать, оставить на 15 минут. Хорошо перемешать перед использованием**).

**Примечание:** Стандарты и контроли готовы к использованию и их не надо разводить.

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие замечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры. Реагенты необходимо смешать без образования пены.
- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.
- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре

## 6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.

1. Разместите по меньшей мере:

- 1 лунка (напр. A1) для бланка субстрата,
- 1 лунка (напр. B1) для отрицательного контроля
- 4 лунки (напр. с C1 и далее) для стандартов 1-4.
- 1 лунка (напр. G1) для положительного контроля

**На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.**

2. Добавить

- 100 мкл готового к исполыз. отриц. контроля в лунку B1,
  - 100 мкл готового к исполыз. стандарта 1 в лунку C1,
  - 100 мкл готового к исполыз. стандарта 2 в лунку D1,
  - 100 мкл готового к исполыз. стандарта 3 в лунку E1,
  - 100 мкл готового к исполыз. стандарта 4 в лунку F1,
  - 100 мкл готового к исполыз. полож. контроля в лунку G1, и
  - 100 мкл каждого разведенного образца пациента в оставшиеся лунки согласно схеме распределения. Оставьте лунку **A1 для бланк-субстрата!**
3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать 1 час при 37 °С.
4. Резко встряхните содержимое лунок и промойте их 5 раз 300 мкл рабочего промывочного раствора.

**Примечание:**

*Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.*

*В конце осторожно удалить остаток жидкости выступая стрипы на салфетку перед следующим этапом!*

- 5. Раскапать 100 мкл готового к использованию Ферментного конъюгата во все лунки кроме A1.
- 6. Накройте лунки пленкой. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °С). Не подвергать воздействию прямого солнечного света!
- 7. Резко встряхните содержимое лунок и промойте их 5 раз 300 мкл рабочего промывочного раствора.
- Примечание:** осторожно удалить остатки жидкости выступая стрипы на салфетку перед следующим этапом!
- 8. Раскапать 100 мкл готового к употр. раствора субстрата во все лунки и опять их накрыть.
- 9. Инкубировать ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °С) в темноте.
- 10. Раскапать по 100 мкл стоп-раствора во все лунки. Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.
- Примечание:** высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!
- 11. Считайте оптическую плотность при 450/620 нм с помощью микротитровального планшетного считывателя в течении 30 минут после добавления стоп-раствора.

## 6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на ноль используя бланк субстрата в лунке A1.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на ноль, используя бланк субстрата в лунке A1, вычитите значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции. Измерьте абсорбцию во всех лунках при 450 нм и запишите значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

**Двойная длина волны – рекомендуется считывать при 620 нм как контрольной длине волны.** Где применимо, вычислите среднее значение абсорбции всех дублей.

## 7. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

- Бланк субстрата в A1: ⇒ значение абсорбции менее 0.100.
- Отриц. контроль в B1: ⇒ значение абсорбции менее 0.200.
- Стандарт 2 (Cut-off) в D1: ⇒ значение абсорбции между 0.300-0.600.
- Положит. контроль в G1: ⇒ значение абсорбции более 0.600.

### 7.2 Определение количественных результатов

Для получения количественного результата в МЕ/мл (IU/ml) выведите (средние) значения абсорбции отрицательного контроля и **Стандартов 1, 2, 3, и 4** в системе координат напротив соответствующих концентраций (**0, 20, 50, 100, и 200 МЕ/мл**) на миллиметровой бумаге (**значения абсорбции по оси Y, концентрации по оси X**) и начертить стандартную калибровочную кривую.

Считать результаты образцов пациентов по этой кривой используя средние значения абсорбции каждого образца пациента.

Возможно использование соответствующих компьютерных программ.

### Примечания:

*В следствие калибровки стандартов Toxoplasma gondii IgG согласно “3-му международному стандарту медицинских препаратов” ВОЗ, могут возникнуть различия в результатах по сравнению с результатами полученными на стандартах калиброванных по “2 му международному стандарту медицинских препаратов”.*

*В этой связи Международная лаборатория биологических стандартов ВОЗ обращает внимание, что класс специфичные антитела IgG к токсоплазме в 3ем международном стандарте должны рассматриваться как антитела низкой avidности.*

### 7.3 Интерпретация количественных результатов

Диапазон начений в норме для данного ELISA набора должен устанавливаться каждой лабораторией на основе данных о пациентах обслуживаемой территории.

Нижеприведенные значения должны использоваться только в качестве ориентиров:

Положительный рез-т:	> 55	МЕ/мл
Серая зона (сомнит.):	45 - 55	МЕ/мл
Отрицательный рез-т	< 45	МЕ/мл

### 7.4 Вычисление качественных результатов

Значение абсорбции **Стандарта 2 (cut-off) = CO**

Пример: 0.47 = CO

**Примечание:** Стандарт 2 используется как cut-off.

### 7.3 Интерпретация качественных результатов

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на 10 % выше CO  
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов от 10 % выше до 10 % ниже CO  
⇒ серая зона ⇒ повторить анализ  
2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

Результат второго анализа опять в «серой зоне»  
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента более чем на 10 % ниже CO  
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

### Информация для заказа:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)