

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АВИДНОСТИ  
АНТИТЕЛ КЛАССА G К *Toxoplasma gondii*

**"Токсо-IgG-авидность"**

**Введение.**

Анализ сыворотки крови пациента включает в себя определение антител, образующихся в организме в ответ на проникновение возбудителя. Первичный иммунный ответ на ранее не встречаемые организмом антигены начинается с продукции IgM. IgG - это поздние антитела в филогенетическом и онтогенетическом отношении. При первичном иммунном ответе они сменяют ранние антитела IgM и накапливаются в организме в значительно больших количествах. IgG обладают наиболее высокими аффинностью и авидностью. Об острой фазе заболевания говорит наличие вирусспецифических антител IgM. Но срок их присутствия в организме варьирует от нескольких недель до месяцев и даже лет. Нарастание уровня IgG происходит в течение нескольких недель. При этом вначале образуются низкоаффинные антитела, образующиеся в начале иммунного ответа при размножении вируса в организме и сохраняющиеся в течение 1-1,5 мес. от начала заболевания. Позже, в процессе созревания иммунного ответа, в организме появляются высокоаффинные IgG антитела. Высокоаффинные антитела остаются в организме длительное время. За счет этих антител развивается быстрый вторичный иммунный ответ в случае повторного попадания возбудителя в организм. В случае латентной инфекции в крови обнаруживаются IgM при обострении или реактивации инфекционного процесса.

В случаях, когда обнаруживаются IgM в крови, необходимо разделять первичную инфекцию и обострение, так как первичная инфекция у беременных женщин ведет к тяжелым последствиям для плода. Кроме того, различаются схемы лечения первичной и латентной инфекций. Для этого рекомендуется определять авидность антител IgG. Если в крови при наличии IgM обнаруживаются IgG с низкой авидностью, то это свидетельствует о первичной (недавней) инфекции. Наличие же высокоавидных антител IgG (в присутствии IgM) говорит о вторичном иммунном ответе в случае попадания возбудителя в организм или обострения (реактивации).

Таким образом, определение авидности антител к данному возбудителю позволяет выделить первичную инфекцию, дифференцировать ее от периода реактивации или вторичного проникновения антигена в организм.

**Принцип метода**

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках параллельных рядов с иммобилизованным антигеном *T.gondii*. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к *T.gondii* связываются с антигеном, формируя комплекс антиген-антитело. На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплекса «антиген-антитело», включающий IgG с более низкими константами связывания (низкой авидностью). На третьей стадии связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляется реакцией с субстратом пероксидазы – перекисью водорода и хромогеном – тетраметилбензидином. После добавления раствора стоп-реагента измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных в комплекс IgG к *T.gondii*.

Индекс авидности рассчитывается как отношение оптической плотности, полученной при выявлении в ИФА специфических IgG в денатурирующем растворе к оптической плотности, полученной при анализе без денатурирующего агента.

**Назначение**

Тест-система предназначена для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii* в сыворотке крови человека для уточнения сроков инфицирования, подтверждения диагноза острого токсоплазмоза и дифференцировки первичного токсоплазмоза от хронической и паст-инфекции.

Тест-система "Токсоплазмоз-IgG-авидность" представляет собой набор реагентов для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii* в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа с использованием денатурирующего раствора (ДР).

Набор состоит из 11 реагентов: иммуносорбент – антиген *Toxoplasma gondii*, сорбированный в лунках планшета; фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т) – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость; денатурирующий раствор (ДР) - прозрачная опалесцирующая жидкость синего цвета; раствор сравнения (РС) - прозрачная опалесцирующая жидкость красного цвета; разводящий раствор для сывороток (РБР-С) – прозрачная опалесцирующая жидкость фиолетового цвета; раствор конъюгата (ПКг-IgG) - моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, – прозрачная жидкость зеленого цвета; высокоавидный положительный контрольный образец (ВПК+) – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к *Toxoplasma gondii*, красная; низкоавидный положительный контрольный образец (НПК+) – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к *Toxoplasma gondii*, синего цвета; отрицательный контрольный образец (К-) - инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая антитела к *Toxoplasma gondii* – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость желтого цвета; хромоген – ТМБ-субстрат – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость; стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость.

Набор рассчитан на проведение 48 анализов, включая контрольные образцы.

Для исследования небольших партий проб возможны 6 независимых постановок по 8 анализа каждая, включая контрольные образцы.

Набор комплектуется всеми необходимыми для ИФА реагентами.

## 1 Приготовление реагентов и исследуемого материала

### 1.1 Приготовление ФСБ-Т

При наличии во флаконе с ФСБ-Т осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  до полного растворения солей.

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл водой дистиллированной.

Хранение: неиспользованный концентрат ФСБ-Т в течение срока годности набора при температуре

от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ , раствор ФСБ-Т – в течение месяца при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ .

### 1.2. Подготовка РБР-С, ДР, РС, РКг-IgG, ТМБ-субстрат

РБР-С, ДР, РС, РКг-IgG, ТМБ-субстрат – готовы к использованию

Хранение: неиспользованные РБР-С, ДР, РС, РКг-IgG, ТМБ-субстрат хранят в течение срока годности набора при температуре от +2 до 8  $^\circ\text{C}$ .

### 1.3. Подготовка контрольных сывороток

К-, ВПК+, НПК+ – готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона до 48 ч при температуре от 20 до 25  $^\circ\text{C}$  и в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ .

### 1.4. Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: не ограничено.

1.5. В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимое количество компонентов для данной серии в соответствии с таблицей.

		Количество используемых стрипов											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Объем, мл	Концентрат ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
	Вода дистиллированная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650

## 2. Подготовка исследуемых сывороток

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 50 мкл. Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не допускать тестирования пула, содержащего несколько образцов сывороток.

Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки с погрешностью измерения объема не более 2 %.

## 3. Проведение ИФА

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до 25  $^\circ\text{C}$ .

3.1 Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3.2. Контрольные образцы сывороток внести попарно по 100 мкл в лунки стрипов для прямого и диссоциирующего ИФА. (например, для прямого ИФА – в лунки стрипов А-1 внести К-; в лунку В1 внести ВПК+; в лунку С1 внести НПК+. А для диссоциирующего ИФА – в лунки стрипов А2 внести К-; в лунку В2 внести ВПК+; в лунку С1 внести НПК+.)

В остальные лунки внести по 100 мкл РБР-С и по 10 мкл анализируемых сывороток в дублях (для прямого и диссоциирующего ИФА). Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

3.3. Планшет промыть три раза ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3.4. Во все лунки стрипов для прямого ИФА внести по 100 мкл раствора сравнения (РС). Во все лунки для диссоциирующего ИФА внести по 100 мкл ДР. После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 10 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

3.5. По окончании инкубации стрипы промыть два раза раствором ФСБ-Т как описано в п.3.3.

3.6. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

3.7. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.3.

3.8. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ-субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 10 мин в защищенное от света место при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

3.9. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

## Учет результатов

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если значение ОП в прямом ИФА в лунках с К- ОП (ОПК-) не более 0,2, в лунках с ВПК+ не менее 1.0 и НПК+ значение ОП не менее 0,6.

Результаты теста считаются положительными, если ОП анализируемой сыворотки больше ОКрит.

ОКрит. рассчитывают по формуле

ОКрит. = ОПК- + 0,2,

Качество тест-системы считать удовлетворительным, если **ИАВПК+ ≥ 50%, ИАНПК+ ≤ 55%**

Индекс avidности (ИА) антител испытуемых сывороток рассчитывают (в %) по формуле:

$$IA = OP_1 \times 100 / OP_2$$

где:

ОП<sub>1</sub> — ОП в лунках с сывороткой, после обработки денатурирующим раствором;

ОП<sub>2</sub> — ОП в лунках с той же сывороткой, после обработки раствором сравнения.

## Пример учета результатов:

После измерения ОП могут быть получены следующие результаты:

ОПК- = 0,073 о.е.

ОП ИФА в РС (растворе сравнения)	ОП ИФА в ДР (денатурирующем растворе)	Индекс avidности (ИА)
ОП ВПК+ = 2.825 о.е.	ОП ВПК+ = 2.145 о.е.	ИА = (2.145 X 100):2.825 = 75.93%
ОП НПК+ = 1.706 о.е.	ОП ВПК+ = 0.644 о.е.	ИА = (0.644 X 100):1.706 = 37.75%
ОП Исс. сыв. = 1.351 о.е.	ОП ВПК+ = 0.756 о.е.	ИА = (0.756 X 100):1.351 = 55.96%

## 3. Интерпретация результатов

Если индекс avidности исследуемой сыворотки менее 30%, то сыворотка содержит низкоavidные антитела, что указывает на первичную инфекцию.

Если индекс avidности более 50%, то сыворотка содержит высокоavidные антитела, что указывает на пост-инфекцию.

“Серая” зона – индекс avidности IgG 30–50% указывает на позднюю стадию первичной инфекции.

## 4. Форма выпуска

Тест-систему "Токсоплазмоз-IgG-avidность" выпускают в виде набора, упакованного в коробку из картона, куда вкладывают инструкцию.

Набор состоит из следующих компонентов: иммуносорбент, запаянный в пластиковый пакет, – 1 шт.; ФСБ-Т по 26 мл - 1 флакон; РБР-С по 10 мл - 1 флакон; РКг-IgG по 12 мл - 1 флакон; ВПК+ по 1,5 мл – 1 флакон; НПК+ по 1,2 мл – 1 флакон; К- по 2.5 мл - 1 флакон; ДР по 8 мл –1 флакон; РС по 8 мл –1 флакон; ТМБ-субстрат по 12 мл – 1 флакон; стоп-реагент по 6 мл - 1 флакон.

## 5. Срок годности, условия хранения и транспортирования

Срок годности набора 9 месяцев.

Хранение при температуре от 2 до 8° С.

Транспортирование производить при температуре от 2 до 8° С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27° С в течение 5 дней.

Не допускать замораживания.

## 6. Краткая схема проведения ИФА.

№ п/п	Наименование операции	Время и температура инкубации
1.	Внести по 100 мкл ВПК+, НПК+, К-, по 100 мкл РБР-С + 10 мкл анализируемых образцов	30 мин. при температуре 37° С
2.	Промыть однократным ФСБТ – 3 раза	Комнатная температура (18- 25° С)
3.	Внести по 100 мкл РС и ДР	10 мин. при температуре 37° С
4.	Промыть однократным ФСБТ – 2 раза	Комнатная температура (18- 25° С)
5.	Внести по 100 мкл раствора конъюгата	30 мин. при температуре 37° С
6.	Промыть однократным ФСБТ – 5 раз	Комнатная температура (18- 25° С)
7.	Внести по 100 мкл ТМБ-субстрата	10 мин. при температуре 37° С
8.	Внести по 50 мкл стоп-реагента	Комнатная температура (18- 25° С)
9.	Измерить ОП при 450 нм	Комнатная температура (18- 25° С)

## 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С ИФА ТЕСТ-СИСТЕМИ.

### 7.1. Общие рекомендации.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
  - не пипетировать растворы ртом;
  - все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).
- Необходимо предъявлять высокие требования к чистоте лабораторной посуды, наконечников, ванночек и т.п., поскольку даже следы применяемых дезинфицирующих и моющих средств приводят к искажению результатов ИФА.
- Предпочтительно использование одноразовой посуды.
  - При многократном использовании контейнера или ванночки для компонента их следует использовать всегда для одного и того же реагента, при повторном применении следует тщательно промыть дистиллированной водой до и после каждого использования.
  - Для работы с набором следует использовать дистиллированную воду высокого качества, так как компоненты набора очень чувствительны к микробиологическому загрязнению, хлорноватистой кислоте и ароматическим хлорсоединениям, ионам металлов, зачастую находящихся в воде.
  - При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий.
  - При использовании автоматического вошера или гребёнки ёмкость и шланги для промывочного раствора рекомендуется 1 раз в неделю обрабатывать 70%-ным спиртом с последующей отмывкой дистиллированной водой.

### 7.2. Требования к анализируемым образцам.

- Для проведения ИФА не рекомендуется использовать гемолизированные, гиперлипидные или повторно замороженные сыворотки.
- Допускается хранение образцов сывороток при 2-8°C в течение 48 часов, либо при температуре минус 20°C в течение 3 месяцев.
- После размораживания образцы тщательно перемешать.
- При необходимости образцы очистить центрифугированием при 5-10 тыс.об/мин.

### 7.3. Возможные причины снижения чувствительности.

- Уменьшение времени инкубации (как правило, субстратной реакции).
- Использование загрязнённой посуды и наконечников.
- Замачивание посуды и наконечников в перекиси водорода или хлорсодержащих растворах без последующего кипячения в процессе мытья.
- Плохая отмывка после инкубации сывороток.
- Растворы, не нагретые перед постановкой до комнатной температуры.
- Размещение планшет в термостате стопкой.
- Низкая температура в лабораторных комнатах (ниже +18°C).
- Нарушение правил и сроков хранения вскрытых компонентов при дробном использовании набора.

### 7.4. Возможные причины ложноположительных результатов из-за погрешностей постановки

- Плохая отмывка на стадии конъюгата.
- Длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации.
- Контаминированный вошер, гребёнка или низкого качества дистиллированная вода.
- Неправильная работа с пипетками.
- Многократное использование наконечников и посуды для ТМБ-субстрата.
- Нерастворённые кристаллы в концентрате отмывающего раствора.
- Сыворотки с бактериальным проростом или с наличием клеточных элементов.