

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»

Бобровник Е.В.



2010 г.

**Инструкция по применению
изделия медицинского назначения**

**«Тест-системы ПЛАТЕЛИЯ (PLATELIA) для
серологической диагностики».**

BIO-RAD

PLATELIA® CHLAMYDIA IgG TMB

КОД **62767**

**Набор для определения IgG антител к хламидии
методом ИФА**

IVD

BIO-RAD LABORATORIES

3, Bd. Raymond Poincare
корп. 14

92430 MARNES-LA-COQUETTE - FRANCE

tel.(1) 47.95.60.00 fax.(1) 47.41.91.33

Адрес московского Представительства:

БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ

125167, Москва, Ленинградский пр., д.37А,

тел: (095) 721 14 04

факс: (095) 721 14 12

СОДЕРЖАНИЕ

1 – КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ	3
2 – ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
3 – СОСТАВ НАБОРА PLATELIA™ CHLAMYDIA IGG TMB.....	3
4 – ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ	4
5 – ЗАБОР ПРОБ, ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЕРЕД ИССЛЕДОВАНИЯМИ И ХРАНЕНИЕ	5
6 – МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.....	6
6.1 – НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ	6
6.2 – РАЗВЕДЕНИЕ РЕАГЕНТОВ	6
6.3 – ХРАНЕНИЕ ОТКРЫТЫХ И / ИЛИ РАЗВЕДЕННЫХ РЕАКТИВОВ.....	6
6.4 – МЕТОДИКА.....	6
7 – ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	7
7.1 – ПРОВЕРКА ПРАВИЛЬНОСТИ АНАЛИЗА	7
7.2 – РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЯ ПОРОГОВОГО УРОВНЯ (ПУ)	8
7.3 – ВЫЧИСЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ОБРАЗЦОВ:	8
8 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ.....	8
9 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	8
9.1 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG TMB	8
9.1.1 – ТОЧНОСТЬ МЕТОДА.....	8
9.1.2 – ИЗМЕРЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ	9
9.2 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG TMB	9
9.2.1 – ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ	9
9.2.2 – ОЦЕНКА ПЕРЕКРЕСТНОЙ СЕРОКОНВЕРСИИ.....	9
10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРИЗВОДСТВА.....	10

1 – КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Chlamydia trachomatis, виды этого возбудителя часто передаются половым путем, и вызывают заболевания, которые являются опасными из-за возникающих осложнений: бесплодие, эктопическая беременность, конъюнктивит и пневмопатии у новорожденных. *Chlamydia psittaci* редко встречаемая у людей, вызывает пневмопатии и внутрисердечные нарушения. *Chlamydia pneumoniae* часто вызывает респираторные инфекции у людей.

При респираторных инфекциях (вызываемых *C. trachomatis*, *C. psittaci*), при хронических формах заболеваний половой сферы и в случаях повторного заражения, всегда отмечается высокий титр антител IgG к хламидии. Значительное повышение уровня антител между двумя сывороточными образцами, полученных от пациента с интервалом в 3 недели, указывает на наличие инфекции.

Диагностический набор PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG TMB предназначен для обнаружения в человеческой сыворотке антител IgG к хламидии (*C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. Pneumoniae*). С помощью этого теста можно определить иммунный статус, при наличии одного образца сыворотки, или обнаружить недавнее инфицирование, при наличии парных образцов сыворотки.

2 – ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на твердофазном «прямом» иммуноферментном анализе (ELISA). Антигены *Chlamydia trachomatis* (L2 серотип) фиксированы на дне лунки. В качестве конъюгата используются меченные пероксидазой моноклональные антитела, специфичные к гамма-цепям иммуноглобулина (IgG) человека.

Первая стадия:

Контрольная и исследуемая сыворотка разбавляются 1 к 21 и последовательно наносятся в лунки микропланшета. В ходе этой инкубации (1 час ± 5 минут при 37°C ± 1°C) присутствующие в пробе антихламидийные IgG антитела связываются с хламидийными антигенами, фиксированные в лунках микропланшета. После окончания инкубационного периода неспецифические IgG и не связавшиеся сывороточные белки удаляют повторяемой промывкой.

Вторая стадия:

В каждую лунку вносят конъюгат (меченные пероксидазой моноклональные антитела, специфичные к человеческой гамма-цепи). В течение второй инкубации, продолжающейся 1 час ± 5 минут при 37°C ± 1°C, меченые антитела связываются с сывороточными IgG, которые прореагировали с хламидийными антигенами. Несвязавшийся конъюгат удаляется промыванием в конце этого инкубационного периода.

Третья стадия:

Добавление субстрата в каждую лунку окрашивает присутствующий иммунный комплекс (хламидийный антиген, сывороточный анти-хламидийный IgG, анти-IgG конъюгат).

Четвертая стадия:

После окончания 30 минутной (± 5 минут) инкубации, проводимой при комнатной температуре (+18-30°C), ферментная реакция останавливается добавлением раствора 1N серной кислоты.

Таким образом, оптическая плотность, зарегистрированная на длине волны 450/620 нм, будет прямо пропорциональна количеству анти-хламидийных IgG, обнаруженных в исследуемом материале. При получении данных, превышающих пороговое значение, можно с уверенностью говорить об инфицировании и определить количество хламидийных антител IgG в исследуемом образце. Интерпретация результатов при исследовании парных сывороток позволяет определить недавнее инфицирование.

3 – СОСТАВ НАБОРА PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG TMB

Срок годности и условия хранения и указаны на коробке.

МАРКИРОВКА	РЕАГЕНТЫ	ФОРМА ВЫПУСКА
R 1	Микропланшет: 12 полосок по 8 лунок в каждой, покрытых инактивированными антигенами <i>Chlamydia trachomatis</i> (серотип L2).	1 микропланшет
R 2	Концентрированный промывочный раствор (10x): TRIS-NaCl буфер (pH 7,4), 1% Tween®20. Консервант: 0,01% Thimerosal	1 флакон 100 мл

R 3	Отрицательный контроль: Человеческая сыворотка не содержащая хламидийных антител и не взаимодействующая с поверхностным антигеном гепатита В (HBs Ag), антитела к гепатиту С (HCV) и антитела к вирусу человеческого иммунодефицита (HIV1+2). Консервант: 0,01% Thimerosal	1 флакон 1 мл
R 4a	Контроль с пороговым значением: Человеческая сыворотка, содержащая антитела IgG и не взаимодействующая с анти-HIV1+2 антителом, HBs антигеном и анти-HCV антителом. Консервант: 0,01%.	1 флакон 1 мл
R 4b	Положительный контроль: Человеческая сыворотка, содержащая хламидийные антитела (IgG) и не взаимодействующая с анти-HIV1+2 антителом, HBs антигеном и анти-HCV антителом. Консервант: 0,01%.	1 флакон 1 мл
R 6	Конъюгат (100x): Мышинные моноклональные антитела специфичные гамма-целям иммуноглобулина человека, меченные пероксидазой хрена. Консервант: 0,01% Thimerosal	1 флакон 0,4 мл
R 7	Растворитель для проб и конъюгата (готов к использованию): TRIS-NaCl буфер (pH 7,6), бычий сывороточный альбумин (BSA), 0,1% Tween® 20 и феноловый красный.	1 флакон 80 мл
R 8	TMB Субстратный буфер (готов к использованию): Раствор лимонной кислоты 0,05М (pH 5,6) и лимоннокислого натрия, содержащий 0.03% H ₂ O ₂ . Консервант: 0,01% Thimerosal	1 флакон 60 мл
R 9	Хромоген: TMB раствор Хромоген: раствор тетраметилбензидина (TMB)	1 флакон 5 мл
R 10	Стоп-реагент (готов к использованию): 1Н раствор серной кислоты	1 флакон 28 мл
	Липкая пленка для микропланшета	4 шт.

4 – ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ

Для получения достоверных результатов должны соблюдаться правила GLP:

- Не используйте реагенты с просроченным сроком годности.
- Не смешивайте и не комбинируйте реагенты из наборов с разными сериями во время проведения одного исследования.

Замечание: При необходимости, возможно использование реактивов из других партий набора, если эта партия используется в пределах данного исследования: промывочный раствор (R2, обозначение: 10x голубой раствор), субстратный буфер (R8, обозначение: TMB buf. голубого цвета), хромоген (R9, обозначение: TMB sol, зеленый) и стоп-реагент (R10, обозначение: 1Н, красный). Эти реактивы могут использоваться с некоторыми другими из наших комплектов. Свяжитесь с нашей технической службой для детальной информации.

- Перед использованием реактивы необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут для стабилизации.
- Осторожно разводите реагенты, избегая любой контаминации.
- Не проводите исследования в присутствии активных реагирующих веществ и паров (кислот, щелочей, альдегидов) или в загрязненных условиях, т.к. это может изменить ферментативную активность конъюгата.
- Используемая стеклянная посуда должна быть тщательно промыта деионизированной водой, однако, предпочтительнее пользоваться одноразовыми материалами.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металлов. Следовательно, металлические предметы не должны соприкасаться с растворами, содержащими конъюгат или субстратный раствор.
- Появление желто-оранжевого окрашивания через несколько минут после добавления OPD таблеток указывает на непригодность реагента и необходимость его замены свежеприготовленным. Приготовление этого раствора должно осуществляться в чистой одноразовой пластиковой или стеклянной посуде, обработанной 1Н HCl, потом тщательно промытой дистиллированной водой и высушенной. Раствор хранится в темном месте.

- Для каждой пробы используйте отдельный наконечник.
- Процедура промывки является наиважнейшим этапом в исследовании: выполняйте рекомендованное количество промывочных циклов и убедитесь, что лунки полностью заполнены, а затем совершенно пустые. Плохая промывка может привести к неправильным результатам.
- Не допускайте высыхания микропланшета между промывками и добавлением реагентов.
- Никогда не используйте одни и те же пипетки и оборудование для внесения конъюгата и субстратного раствора.
- Проверьте пипетки и другое оборудование на точность.
- Не изменяйте рецептуру методики.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

- Надевайте одноразовые перчатки во время работы с реактивами.
 - Все реактивы предназначены для проведения диагностики *in vitro*.
 - Ни при каких обстоятельствах не пипетируйте ртом.
 - Ни один метод детекции не может дать абсолютной гарантии отсутствия в контрольных материалах ВИЧ, вирусов гепатитов В и С или других инфекционных агентов. Работайте со всеми реагентами как с потенциально опасным материалом, соблюдая соответствующие меры предосторожности.
 - Избегайте разливания или разбрызгивания образцов или реагентов, в случае пролития реагентов содержащих кислоту, ее необходимо нейтрализовать бикарбонатом натрия, затем очистить отбеливателем в концентрации 12° разбавленного 1/10 и высушить фильтровальной бумагой. Материалы, использованные для уборки, считаются потенциально опасными и должны быть выброшены в контейнер для биологически зараженных отходов.
 - Пробы, полученные от пациентов, реактивы, содержащие материал человеческого происхождения, так же как и контаминированный материал и предметы должны быть выброшены только после деконтаминации.
- Выдержите в течение 30 минут в отбеливающем растворе, состоящем из 1 части домашнего отбеливателя (15% гипохлорид натрия) и 10 частей водного раствора или воды.
- Стерилизуйте в течение 2 часов в автоклаве в 121 °C.
- Не помещайте в автоклав растворы, содержащие гипохлорит натрия.
 - Избегайте контакта субстратного буфера, хромогена, промывочного и останавливающего раствора с открытыми участками кожи и слизистыми (угроза отравления, воспаления, ожогов).
 - Материалы по безопасности (MSDS) доступны после запроса.
 - Хламидийные антигены были инаktivированы CHAPS-SDS обработкой.

5 – ЗАБОР ПРОБ, ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЕРЕД ИССЛЕДОВАНИЯМИ И ХРАНЕНИЕ

1. Рекомендуемый тип образцов – сыворотка, собирается в сухие пробирки.
2. Соблюдайте следующие рекомендации по приготовлению, работе и хранению сывороточных образцов:
 - Забор сыворотки проводят обычным способом, принятым в лабораторной практике.
 - Перед центрифугированием позвольте образцам полностью свернуться.
 - Пробирки все время держите закрытыми.
 - После центрифугирования отделите сыворотку и храните в тщательно закрытой таре.
 - Пробы, исследование которых будет проведено в течение 24 часов, следует хранить при температуре + 2 - 8 °C. Если исследование не будет проводиться в течение 7 дней или пробы подлежат перевозке, то температура хранения должна составлять -20 °C или ниже.
 - Допускается только однократное размораживание проб. После размораживания перед исследованием образец должен быть тщательно перемешан.
3. Не было проверено влияние высоких уровней липидов, гемоглобина, альбумина или билирубина на результат исследования.
4. Не нагревайте пробы.

6 – МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

6.1 – НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Бикарбонат натрия и гипохлорит натрия (отбеливатель).
- Фильтровальная бумага.
- Одноразовые резиновые перчатки.
- Защитные очки.
- Одноразовые пробирки.
- Автоматические/полуавтоматические пипетки с фиксированным или переменным объемом для распыливания объемом 10 -1000 мкл и 1 мл, 2 мл, 10 мл.
- Мерные дозирующие цилиндры на 25 мл, 50 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Встряхиватель типа Vortex.
- Автоматическая, полуавтоматическая или ручная система для промывки микропланшет*.
- Инкубатор или водяная баня с регулируемой температурой инкубации ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).
- Специальный контейнер для биологически зараженных отходов.
- ИФА-ридер (спектрофотометр) для микропланшет (оснащенный фильтрами с длиной волны 450/620 нм)*.

(*) Детальную информацию о рекомендованном оборудовании запрашивайте в техническом отделе.

6.2 – РАЗВЕДЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

R2: Растворите 100 мл реагента R2 в 900 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения промывочного рабочего раствора.

R6: Для приготовления рабочего раствора конъюгата на один микропланшет, смешайте 0,25 мл концентрированного конъюгата с 25 мл растворителя (R7) (для одного стрипа возьмите десятую часть от полученного раствора).

R8 + R9: Разведите 1:11 хромоген (R9) в субстратном буфере (R8) (например: 1 мл реактива R9 + 10 мл реактива R8). Гомогенизируйте.

6.3 – ХРАНЕНИЕ ОТКРЫТЫХ И / ИЛИ РАЗВЕДЕННЫХ РЕАКТИВОВ

R1: Вскрытый пакет с неиспользованными полосками можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 1 месяца в хорошо закрытой упаковке (проверьте наличие сорбента).

R2: После приготовления раствор стабилен в течение 2 недель при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$. Концентрированный раствор хранится при $+2-25^{\circ}\text{C}$, при отсутствии контаминации может использоваться до конца срока годности, указанного на упаковке.

R6: Приготовленный раствор сохраняет стабильность в течение 8 часов при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$) и свыше 24 часов при 4°C .

R9: Разведённый раствор сохраняет свои свойства в течение 6 часов в темноте при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$).

6.4 – МЕТОДИКА

Точно следуйте указанной методике.

Для получения достоверных результатов используйте контрольную сыворотку в каждой серии исследований.

Непосредственно перед применением реактивы должны прогреться до комнатной температуры ($+18-30^{\circ}\text{C}$).

1. Составьте схему нанесения на микропланшет контрольных и исследуемых сывороток, аналогично ниже приведенной.

2. Приготовьте рабочий промывной раствор (раствор R2) (см. раздел 6.2).

3. Извлеките рамку и необходимое количество стрипов из упаковки.

4. Один раз промойте стрипы рабочим промывочным раствором (R2). Переверните планшет и аккуратно стряхните оставшуюся жидкость на фильтровальную бумагу.

5. Разведите контрольные и исследуемые образцы 1:21 растворителем (R7) либо непосредственно в микропланшете, либо в разделительных пробирках:

А) Разведение в планшете: Внесите 200 мкл растворителя (R7) в каждую лунку.

Лунка A1 10 мкл отрицательной контрольной сыворотки (R3)

Лунка B1, C1 10 мкл положительной сыворотки, стандарт I (R4a)

Лунка D1 10 мкл положительной сыворотки, стандарт II (R4b)

Пробы: внесите 10 мкл каждого образца в лунки, начиная с E1.

Важно избежать неспецифического связывания белка, для этого соблюдайте следующую последовательность: внесите сначала 200 мкл растворителя (R7) в лунку, добавьте 10 мкл пробы или контроля, последовательно перемешайте 5-7 раз.

Б) Разведение в пробирках:

Предварительно разведите контроли и образцы 1:21 (например: 25 мкл сыворотки + 500 мкл растворителя). Хорошо перемешайте. Внесите уже разведенные сыворотки по следующей схеме:

Лунка A1 200 мкл разведенного отрицательного контроля (R3)

Лунка B1, C1 200 мкл разведенной сыворотки с пороговым значением (R4a)

Лунка D1 200 мкл разведенной положительной контрольной сыворотки (R4b)

Пробы: внесите 10 мкл каждого образца в лунки, начиная с E1.

6. Контроль с пороговым значением дублируется.

Схема идентификации для двух стрипов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4a	S6										
C	R4a	S7										
D	R4b	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

7. Накройте микропланшет липкой лентой. Инкубируйте микропланшет в сухом инкубаторе при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 часа $\pm$ 5 минут.

8. Перед окончанием первого инкубационного периода приготовьте рабочий раствор конъюгата (R6). Для одного микропланшета к 0,25 мкл конъюгата (R6) добавьте 25 мкл растворителя (R7). Хорошо перемешайте.

9. По окончании инкубации, удалите содержимое ячеек и промойте микропланшет 3 раза.

10. Добавьте 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6) в каждую лунку. Накройте микропланшет липкой лентой.

11. Инкубируйте микропланшет при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 часа $\pm$ 5 минут.

12. Приготовьте субстратный хромогенный раствор (R8 + R9).

13. По окончании инкубации, удалите содержимое ячеек и промойте микропланшет 4 раза.

14. В каждую лунку добавьте 200 мкл субстратного хромогенного раствора (R8 + R9), при этом избегайте яркого света.

15. Инкубируйте микропланшет в темном месте при комнатной температуре ($+18-30^\circ\text{C}$) в течение 30 ± 5 минут.

16. Добавьте по 100 мкл стоп-реагента (R10) в каждую лунку в той же последовательности и в тех же разведениях, как для субстратного раствора.

17. Осторожно вытрите дно плашки.

18. Определите оптическую плотность (OD) в каждой лунке на длинах волн 450/620 нм. Результаты необходимо снять в течение 30 минут после остановки реакции.

19. Проверить соответствие между результатами считывания и планшетом, а также планом образцов и их реальным внесением в стрипы.

7 – ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1 – ПРОВЕРКА ПРАВИЛЬНОСТИ АНАЛИЗА

Используйте контрольную сыворотку в каждом исследовании для каждого микропланшета. Для правильной интерпретации результатов должны быть соблюдены следующие критерии.

- **Величина оптической плотности (OD):**

OD R3 < 0,175

OD R4a > 0,175

OD R4b > 0,500

- **Соотношения:**

OD R4a / OD R3 > 1,3

OD R4b / OD R4a > 2

Если критерии качества не соблюдены, следует провести повторный тест.

7.2 – РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЯ ПОРОГОВОГО УРОВНЯ (ПУ)

Соответствует среднему значению оптической плотности ПУ сыворотки

ПУ = среднее OD R4a

7.3 – ВЫЧИСЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ОБРАЗЦОВ:

Оптическая плотность пробы	Результат	Интерпретация
$OD_n < ПУ \times 0,8$	Положительный	Отсутствие хламидийной инфекции
$ПУ \times 0,8 < OD_n < ПУ$	Сомнительный	Результаты должны быть подтверждены спустя 15-20 дней после первого анализа
$OD_n \geq ПУ$	Отрицательный	Вероятное присутствие хламидийной инфекции: Результаты должны быть подтверждены спустя 15-20 дней после первого анализа

8 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Современная диагностика инфекционных заболеваний должна осуществляться на основе данных серологических и клинических исследований. Результаты только серологических исследований не могут однозначно подтвердить диагноз. Для постановки точного диагноза о наличии инфекции необходимо исследование более одного сывороточного образца. В случае подозрения на наличие инфекции или при получении результатов со значениями, близкими к пороговому уровню, рекомендуется исследовать сывороточные образцы от тех же пациентов, взятые через 15-20 дней и исследуемые по той же методике.

9 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЙ

9.1 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG TMB

9.1.1 – ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

• Воспроизводимость внутри исследований

Анализ трех положительных образцов и одного отрицательного проводили 30 раз подряд. Для каждого образца определяли отношение порогового значения оптической плотности образца к среднему пороговому значению оптической плотности контроля (R4a). Значения соотношений оптической плотности, стандартное отклонение и коэффициент вариации для каждого из образцов представлены ниже в таблице.

N = 30	Отрицательная проба	Положительная проба 1	Положительная проба 2	Положительная проба 3
Отношение (OD пробы / OD контроля)				
Среднее значение	0,43	1,45	2,65	4,96
Среднеквадратичное отклонение	0,05	0,11	0,19	0,32
Коэффициент вариации, %	11,79	7,51	7,16	6,41

• Воспроизводимость между исследованиями

Те же 4 образца (один отрицательный и 3 положительных) были исследованы парно в течение 20 дней, по 2 исследования в день. Для каждого образца определяли отношение порогового значения оптической плотности образца к среднему пороговому значению оптической плотности контроля (R4a). Значения соотношений оптической плотности, стандартное отклонение и

коэффициент вариации для каждого из образцов представлены ниже в таблице.

N = 30	Отрицательная проба	Положительная проба 1	Положительная проба 2	Положительная проба 3
Отношение (OD пробы / OD контрля)				
Среднее значение	0,32	1,07	2,17	4,32
Среднеквадратичное отклонение	0,03	0,13	0,37	0,67
Коэффициент вариации, %	9,10	12,62	17,21	15,53

Коэффициент вариации вычисленный для положительной сыворотки составляет менее 8% для воспроизводимости внутри исследований, и меньше чем 17,5% для воспроизводимости между исследованиями.

9.1.2 – ИЗМЕРЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

Сравнительные исследования проводили между тест-системами PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG TMB (62767) и PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG OPD (62766) при исследовании 184 образцов доноров крови (отрицательных и положительных). Полученные результаты представлены в таблице:

Platelia™ Chlamydia IgG (62766)				Общее число проб
Platelia™ Chlamydia IgG TMB (62767)	Отрицательные	Сомнительные	Положительные	
Отрицательные	99	2*	1*	102
Сомнительные	6*	7	3*	16
Положительные	1*	0	65	66
Общее число проб	106	9	69	184

В ходе исследований у одного образца были получены различные результаты: тест-система OPD показала положительное значение, тогда как TMB – сомнительное.

Отношение соответствия между тест-системами составляет: $(172/173) \times 100 = 99,4\%$.

Результаты показывают, что модификации, проведенные в комплекте Platelia™ Chlamydia IgG TMB (62767) не влияют на характеристики, представленные ниже, которые были получены для тест-системы Platelia™ Chlamydia IgG OPD (62766).

9.2 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ PLATELIA™ CHLAMYDIA IGG TMB

9.2.1 – ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Действия PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG были оценены в 2 различных местах методами иммунофлуоресценции и ИФА, используя проверочные препараты в сравнительном анализе.

• Исследование специфичности

Специфичность PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG была оценена на 212 пробах и составила 97,6% (207/212).

• Исследование чувствительности

При исследовании 196 проб, полученных от пациентов у которых была обнаружена инфекция, вызванная *C. Pneumoniae* или *C. Trachomatis*, чувствительность PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG составила 192/196=97,9%

9.2.2 – ОЦЕНКА ПЕРЕКРЕСТНОЙ СЕРОКОНВЕРСИИ

С целью определения перекрестной сероконверсии были исследованы 120 проб, в которых были выявлены антитела к цитомегаловирусу, вирусу простого герпеса, *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida albicans*, пробы, положительные к ревматоидному фактору, аутоантителам и Bio-Rad Laboratories

гетерофильным антителам тест-системой PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG. Образцы, показавшие положительный результат с PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG, контролировали используя другой коммерческий ИФА тест. Если результаты были разными, эти образцы испытывали третьей ИФА тест-системой.

Среди 120 исследованных образцов, 48 показали отрицательный результат, 64 образца положительный результат и 8 образцов, проверенных двумя другими тест-системами, выявили различие результатов. После исследования спорных результатов третьим ИФА тестом, PLATELIA™ CHLAMYDIA IgG не давала перекрёстных реакций с проверочными инфекционными препаратами.

10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРИЗВОДСТВА

Все производственные и коммерческие реагенты, начиная со стадии получения неочищенных материалов и до последней стадии получения готового продукта, проходят в должных условиях. Каждая серия подвергается качественному контролю и в продажу поступают только те образцы, которые имеют допустимые показатели критериев.

Данные относительно производства и контроля каждой серии хранятся в нашей компании.

ПЛАТЕЛИЯ™ ТОКСО IgA ТМБ

72737

Качественное определение анти-*Toxoplasma gondii* IgA в человеческой сыворотке иммуноферментным методом

IVD

Все произведенные реагенты изготавливаются в соответствии с нашей системой качества, начиная с получения сырья до конечной реализации продукта. Любой лот поступает на рынок только после прохождения строгой процедуры контроля на предмет соответствия определенным критериям. Вся информация относительно продукта и его контроля хранится в компании «Био-Рад».

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ
2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
3. ПРИНЦИП МЕТОДА
4. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ
5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ
6. ОБРАЗЕЦ
7. ПРОЦЕДУРА
8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ
9. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА
10. ХАРАКТЕРИСТИКИ
11. ИСТОЧНИКИ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ПЛАТЕЛИЯ™ ТОКСО IgA TMB in-vitro диагностический набор обеспечивающий качественное определение анти-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) IgA.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

T. gondii – простейшее, вызывающее инфекции у млекопитающих разных видов и птиц. Токсоплазмоз, часто встречающийся у человека и животных, в основном асимптоматичен. Уровень распространения этой инфекции в популяции, установленный использованием серологических тестов, может отличаться в зависимости от страны возникновения и возраста. Токсоплазмоз в течении беременности влечет за собой серьезные врожденные аномалии (в частности, нарушение функций мозга) и иногда мертворождение. Обнаружение токсо IgG антител у женщины перед зачатием обеспечивает гарантированную внутриутробную защиту от возможного токсоплазмоза в течении беременности. Предрасположенность к тяжелым токсоплазмозным инфекциям часто встречается у людей болеющих СПИД или с другими ослаблениями иммунитета. Эти инфекции преимущественно в следствие того, что цисты *T. gondii* появляются перед ВИЧ инфекцией. Специфическое диагностирование *T. gondii* инфекции может быть сложным и выделение паразита встречается редко. Серологическое подтверждение *T. gondii* антител показывает на контакт с паразитом и стало широко принятым в качестве способа определения иммунного статуса и предрасположенности к инфекции. Изучение различных изотипов позволяет также датирование *T. gondii* и осуществление адекватной терапии в случае недавней инфекции или предложение профилактических рекомендаций: руководство по гигиене и диете для беременных женщин, химио-профилактика в иммунодефицитной популяции.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

ПЛАТЕЛИЯ™ ТОКСО IgA TMB твердофазный иммуноферментный двух- слойный метод, с фиксированием IgA антител на твердой фазе (анти человеческие анти-цепочечные антитела нанесены на микропланшет). Peroксидаза-меченные моноклональные антитела специфичные к *T. gondii* направлены против поверхностного антигенного белка, PM 30 000, одной из главных целей гуморального иммунного ответа.

Первая стадия.

Отрицательный, граничных значений и положительные контроли и образцы растворяются 1/101 (1/20 для сывороток эмбриональных и новорожденных) и помещаются в лунки микроплшета. В течении инкубации 1 час при 37°C, IgA присутствующий в образце улавливается твердой фазой. После инкубации, IgG и другие протеины сыворотки удаляются промывкой.

Вторая стадия.

Раствор содержащий антиген *T. gondii* (*T. gondii* Ag, RH штамм) и моноклональное антитело к *T. gondii* помеченное пероксидазой хрена (ACM-POD) вносятся в каждую лунку. В течении инкубации один час при 37°C IgA антитела *T. gondii* содержащиеся в образце, которые фиксируются на твердой фазе, образуют *T. gondii* антиген-конъюгат комплекс. Избыток *T. gondii* антигена и конъюгата удаляется промывкой.

Третья стадия.

Наличие иммунного комплекса (анти IgA твердая фаза, анти- *T. gondii* IgA, *T. gondii* Ag, анти-*T. gondii* Ag конъюгат) показывается добавлением раствора, содержащего пероксидазный субстрат и хромоген инициирующий реакцию проявления цвета.

Четвертый шаг.

После получасовой инкубации при комнатной температуре (18-30°C), ферментативная реакция останавливается добавлением 1 Н серной кислоты. Оптическая плотность считывания при 450/620 нм пропорциональна количеству *T. gondii* IgG антител присутствующих в образце. Присутствие *T. gondii* IgA антител определяется сравнением оптической плотности считываемой для образца по отношению к оптической плотности считываемой для контрольной сыворотки предельного значения.

4. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

Все реактивы подготовлены предназначены для in vitro диагностического использования.

Маркировка		Реактивы	Количество
R1	Микропланшет	Микропланшет (Готовы к использованию): 12 полос по 8 лунок в каждой, покрытых анти - альфа-цепочечными антителами	1
R2	Концентрированный промывочный раствор (10×)	Концентрированный промывочный раствор (10×): ТРИС-NaCl буфер (pH 7,4), 1 % твин® 20. Консервант: 0,01% тимеросал.	1 сосуд 100 мл
R3	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль: человеческая сыворотка отрицательная для <i>T. gondii</i> IgA антител, и отрицательная для гепатита В Ag, для ВИЧ1 и ВИЧ2 антител и антител к вирусу гепатита С. Консервант: 0,01% тимеросал.	1 сосуд 1 мл
R4a	Контроль предельного значения	Контроль предельного значения: Человеческая сыворотка положительная для <i>T. gondii</i> IgA антител, и отрицательная для гепатита В Ag, для ВИЧ1 и ВИЧ2 антител и антител к вирусу гепатита С. Консервант: 0,01% тимеросал.	1 сосуд 1 мл
R4b	Положительный контроль	Положительный контроль: Человеческая сыворотка положительная для <i>T. gondii</i> IgA антител, и отрицательная для гепатита В Ag, для ВИЧ1 и ВИЧ2 антител и антител к вирусу гепатита С. Консервант: 0,01% тимеросал.	1 сосуд 1 мл

R6a	Антиген	Токсоплазмозный антиген (лиофилизированный), RH штамм	4 сосуда по 3 мл
R6b	Конъюгат (80х)	Конъюгат: мышинные моноклональные антитела анти- <i>T. gondii</i> соединенные с пероксидазой хрена. Концентрированные в 80 раз	1 сосуд 0,4 мл
R7	Растворитель	Растворитель для образцов и конъюгата (Готовый к использованию): ТРИС-NaCl буфер (pH 7,7±0,15), бычий альбумин, 0,1% твин® 20 и феноловый красный	2 сосуда по 80 мл
R8	ТМБ субстратный буфер	ТМБ субстратный буфер: Раствор лимонной кислоты и ацетата натрия (pH 4,0), содержащий 0,015% H ₂ O ₂ и 4% ДМСО.	1 сосуд 60 мл
R9	ТМБ хромоген	Хромоген: 0,25% тетраметилбензидин (ТМБ) раствор	1 сосуд 5 мл
R10	Фиксирующий раствор	Фиксирующий раствор (готов к использованию): раствор 1 Н серной кислоты	1 сосуд 28 мл
		Липкая пленка для микропланшета	4

5. БЕЗОПАСНОСТЬ И ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующей надлежащей лабораторной практики:

- Не используйте реактивы после окончания срока годности
- Не смешивайте и не объединяйте реактивы из разных партий при проведении одного теста.

Примечание: Возможно использовать другие партии чем те, которые содержатся в наборе, в том случае, если используется та же партия в данном исследовании: промывочный раствор (R2, идентификационная этикетка: 10хсиний), субстратный буфер (R8, идентификационная этикетка: ТМБ буфер синий), хромоген (R9, идентификационная этикетка: ТМБ раствор зеленый) и фиксирующий раствор (R10 идентификационная этикетка: 1 Н красный). Эти реактивы могут использоваться с некоторыми нашими другими продуктами. Контактируйте с нашим техническим сервисом для полной подробной информации.

- Перед использованием, если необходимо подождите 30 мин чтобы стабилизировать реагенты до комнатной температуры.
- Осторожно восстановите реактивы исключая любую контаминацию.
- Не проводите ваш тест в присутствии химически активных испарений (испарения кислот, щелочей, альдегидов) или в загрязненных условиях, это может изменить ферментативную активность конъюгата.
- Используйте стеклянную посуду тщательно вымытую и ополоснутую деионизованной водой или предпочтительно одноразовые материалы.
- Не допускайте высушивание микроплат между концом отмывки и внесением реагентов.

- Ферментативная реакция очень чувствительна к ионам металлов. Соответственно, не допускайте контакта металлических предметов с раствором конъюгата или субстрата.
- Проявляющийся раствор (субстратный буфер + хромоген) может быть бесцветным. Появление синего цвета в течении нескольких минут после восстановления показывает что реактив не может быть использован и должен быть заменен. Подготовка этого раствора может делаться в чистых одноразовых единойжды используемых пластиковых поддонах или стеклянных контейнерах, которые предварительно промыты 1 Н HCl и сполоснуты тщательно дистиллированной водой и высушены. Хранить раствор в темноте.
- Используйте новые наконечники для пипеток для каждого образца.
- Промывка микроплат – критическая стадия в процедуре: не нарушайте рекомендованное количество промывочных циклов и убеждайтесь что все лунки полностью наполнены и затем полностью освобождены. Некорректное промывание может приводить к неточным результатам.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для внесения конъюгата и проявляющего раствора.
- Проверяйте пипетки и другие инструменты для правильной и точной работы.
- Не изменяйте процедуру исследования.

ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ И ГИГИЕНЕ

- Все реактивы подготовлены и предназначены для диагностики *in vitro*.
- Надевайте одноразовые перчатки, когда работаете с реактивами.
- Не пипетируйте ртом.
- Материал человеческого происхождения использованный в подготовке реагентов тестирован и не обнаружена реакционная способность для поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антител к гепатиту С и к вирусу иммунодефицита человека. Так как метод не может абсолютно гарантировать отсутствие инфекционных агентов, обращаться с реактивами человеческого происхождения и образцами пациентов как со способными переносить инфекционные заболевания.
- Рассматривайте любой материал непосредственной контактирующий с образцами и реактивами человеческого происхождения так же как и отмывочный раствор как инфекционный материал.
- Избегайте проливания образцов или растворов контактирующих с образцами.
- Пролитые жидкости должны быть залиты 10% раствором хлорной извести. Если контаминирующая жидкость – кислота, пролитые жидкости сначала должны быть нейтрализованы бикарбонатом натрия, затем очищены раствором хлорной извести и высушены фильтровальной бумагой. Материал использованный для очищения должен быть выброшен в контейнер с контаминированными отходами.
- Образцы, реактивы человеческого происхождения, так же как и контаминированный материал и продукты должны выкидываться после деконтаминации.

- или замачиванием в растворе хлорной извести при конечной концентрации 5 % гипохлорида натрия в течении 30 мин;
- или автоклавированием при 121⁰С минимум 2 часа. Автоклавирование менее одного часа при 121⁰С, лучший способ инактивировать ВИЧ вирусы и вирусы гепатита.

ВНИМАНИЕ: НЕ ВНОСИТЬ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ В АВТОКЛАВ.

- Размещать реактивы и обращаться с ними следует в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.
- Исключать контакт субстратного буфера, хромогена и фиксирующего раствора с кожей или слизистыми оболочками (опасность токсичности, раздражения или ожога).

Данные о безопасности доступны по запросу.

6. ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка или плазма (ЭДТА, цитрат и гепарин) – рекомендованные типы образцов.
2. Обратите внимание на следующие рекомендации для обработки, технологического процесса и хранения образцов крови:
 - Собрать все образцы крови обращая внимания на обычные меры предосторожности для венопункции.
 - Для сыворотки, дать образцам полностью свернуться перед центрифугированием.
 - Хранить пробирки все время закупоренными.
 - После центрифугирования отделить сыворотку или плазму от сгустка или эритроцитов в плотно закрытые пробирки для хранения.
 - Образцы могут храниться при +2-8⁰С если исследование длится в течении 7 дней.
 - Если анализ не будет завершен в течении 7 дней или для транспортировки образцов, замораживать при -20⁰С или менее.
 - Не размораживайте образцы более чем 3 раза.
 - Предварительно замороженные образцы должны тщательно перемешиваться после размораживания перед тестированием. Тест выполняется с сывороткой, разведенной 1/101. Так как количество IgA образованного у эмбриона или новорожденного меньше чем у взрослого разводите эти сыворотки 1/20.
3. Образцы содержащие 90 г/л альбумина, 100 мг/л билирубина, липемические образцы содержащие эквивалентные количества 36 г/л триолеина (триглицерида) и гемолизированные образцы содержащие до 10 г/л гемоглобина не оказывают влияния на результат.
4. Не нагревайте образцы.

7. МЕТОДИКА

7.1. Необходимые, но не входящие в набор материалы

- Перемешивающее устройство Vortex
- Микропланшетный ридер с фильтрами с длиной волны 450 нм и 620 нм (*)
- Водяная баня или равноценный инкубатор для микропланшет, с температурой инкубации 37±1⁰С (*).
- Ручная, полуавтоматическая или автоматическая система для промывки микроплат (*).

- Контейнер для биологически опасных отходов.
- Гипохлорид натрия (хлорная известь) и бикарбонат натрия.
- Дистиллированная или деионизованная вода.
- Градуированные цилиндры емкостью 25, 50, 100 и 1000 мл.
- Одноразовые латексные перчатки.
- Защитные или стеклянные очки.
- Фильтровальная бумага.
- Автоматические или полуавтоматические, регулированные или с фиксированным объемом одно- или многоканальные пипетки для измерения и дозирования 10-1000 мкл и 1, 2 и 10 мл.
- Одноразовые пробирки.

(*) консультируйтесь у нас о подробной информации об оборудовании рекомендованном нашим техническим департаментом.

7.2. Разведение реактивов

- **R1:** разрежьте пакет 0,5-1 см выше линии. Верните неиспользованную полоску в пакет немедленно. Проверьте влагопоглотитель. Снова запечатайте пакет осторожно и храните при +2-8°C.
- **R2:** Разведите 1/10 в дистиллированной воде. Подготовьте 350 мл для одного 12 полосочного плата если промывка ручная.
- **R3, R4a, R4b:** Разведите 1/101 с R7 (пример: 10 мкл R3 + 1,0 ml R7).
- **R6a:** Разведите лиофилизированный антиген добавлением 3 мл растворителя (R7) в один сосуд с антигеном. Единожды разведенный раствор антигена должен быть абсолютно прозрачным. Один сосуд может быть использован для 3 полосок.

Примечание: реактив не может использоваться если появляется значительное помутнение. В этом случае замените реактив.

Раствор антигена должен быть немедленно помещен на -20°C после растворения (расмораживать антиген только однажды). В этом случае, антиген может храниться 3 месяца при 20°C.

- **R6b:** пероксидаза помеченная моноклональными антителами – концентрированный в 80 раз раствор. Для одного микроплата растворите 0,150 мл конъюгата (R6b) в 12 мл растворителя (R7). Тщательно перемешайте. Разтворенный конъюгат должен использоваться немедленно.
- **Рабочий раствор конъюгата: растворенный R6a + растворенный R6b:** для одного микроплата соедините 12 мл разведенного конъюгата (разведенный R6b) и 12 мл разведенного антигена (растворенный R6a) (4 сосуда). Разделите эти объемы на 12 для 1 полоски.
- **R9:** Развести 1/11 с R8, например 1 мл R9 + 10 мл R8.

7.3. – Хранение открытых и/или разведенных реактивов.

- **R1:** В открытом пакете неиспользованные полоски хранятся 1 месяц при +2-8°C в повторно запечатанном пакете.
- **R2:** Разведенный раствор стабилен до 2 недель при +2-8°C. Концентрированный раствор хранится при 2-25°C, при отсутствии микробиологического загрязнения стабилен до даты окончания срока годности, указанной на этикетке.

- **R6:** Однажды разведенный раствор стабилен до 4 часов при комнатной температуре (+18-30°C).
- **R9:** Однажды разведенный раствор стабилен 6 часов в темноте при комнатной температуре (+18-30°C).
- **R3, R4a, R4b, R7 и R10:** реактивы хранятся при +2-8°C, при отсутствии контаминации, стабильны до даты окончания срока годности показанной на этикетке (даже если открыты).

7.4. Методика.

Строго следуйте методике анализа. Используйте калибратор при каждой «пробежке» чтобы валидировать результаты анализа. Перед использованием, дайте реактивам достигнуть комнатной температуры (+18-30°C).

1. Составьте схему нанесения и идентификации образцов.
2. Растворите R2 как предписано (см.п. 7.2).
3. Возьмите рамку и полоски (R1) из упаковки.
4. Промойте микропланшетную полоску один раз разведенным R2. Переверните микропланшет и осторожно потряхните на фильтровальную бумагу чтобы удалить оставшуюся жидкость.
5. Растворите тестируемый образец и контроль в растворе R7 1/101: 10 мкл образца и 1 мл растворителя R7. Тщательно перемешайте (с помощью вортекса).
6. Добавьте 200 мкл разведенных 1/101 контролей (R3, R4a, R4b) и разведенных 1/101 тестируемых образцов (S1, S2 и т.д.) в лунки как предлагается ниже:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R5a	S6										
C	R4a	S7										
D	R4b	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

7. Накройте планшет липкой пленкой, нажимая на плато, чтобы обеспечить полное прилегание пленки. Инкубировать планшет в термостате, контролируемой водяной бане или в микропланшетном инкубаторе при 37±1°C 1 час ± 5 минут.
8. До окончания инкубирования, подготовьте необходимое количество раствора конъюгата R6b и антигена R7a. Подготовьте рабочий раствор конъюгата (см.п. 7.2.).
9. В конце первого инкубационного периода удалите липкую ленту. Удалите содержимое лунок в контейнер для биологически опасных отходов (содержащий гипохлорид натрия). Промойте микропланшет 3 раза. Переверните микропланшет и аккуратно стряхните на фильтровальную бумагу чтобы удалить оставшуюся жидкость.
10. Добавьте 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6a+R6b) во все лунки. Раствор должен быть осторожно перемешан перед использованием.

11. Накройте планшет липкой пленкой, нажимая на плато, чтобы обеспечить полное прилегание пленки. Инкубировать планшет в термостате, контролируемой водяной бане или в микропланшетном инкубаторе при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 1 час $\pm$ 5 минут.

12. Удалите липкую пленку, аспирируйте все лунки и отмойте 4 раза как описано выше. Переверните микропланшет и осторожно встряхните на фильтровальную бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

13. Подготовьте ферментативный проявляющий раствор (R8+R9) (см.п. 6.2.) и добавьте 200 мкл в каждую лунку. Позвольте реакции проявляться в темноте 30 мин $\pm$ 5 минут при комнатной температуре ($+18-30^\circ\text{C}$). Не используйте липкую ленту для плат в течении этой инкубации.

14. Добавьте 100 мкл фиксирующего раствора (R10) в каждую лунку используя ту же самую последовательность и скорость как при внесении проявляющего раствора.

15. Тщательно вытрите нижнюю часть планшета. Считывайте оптическую плотность при 450/620 нм используя планшетный ридер в течении 30 мин после окончания реакции (полоски должны всегда храниться вдали от света до считывания).

16. Проверьте все результаты для согласования между спектрофотометрическим и визуальным считыванием и на фоне микропланшета и внесения образца, схемы идентификации.

8.ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Валидация анализа

Включайте все калибраторы для каждого повтора теста. Для валидации анализа следующие критерии должны соответствовать.

- Значения ОП
ОП R4b > 0,500
- Нормы:
Средняя величина ОП R4a/ОП R3 > 1.500
ОП R4b/среднее значение ОП R4a > 1.500

Если спецификации не соответствуют, тест должен быть повторен.

8.2. Расчет предельного значения (ПЗ)

ПЗ = среднему значению ОП R4a

8.3. Расчет коэффициента образца

Коэффициент образца = ОП образца / ПЗ (среднее значению ОП R4a)

Результат должен так же выражаться расчетом установленного коэффициента.

Установленный коэффициент образца = (ОП образца - ОП ср R4a) / (ОП R4b - ОП ср R4a) $\times$ 10.

8.4. Интерпретация результатов

Значение	Результат	Интерпретация
≥ 1.00	положительный	Требовались определение специфического IgM и количественный анализ анти- <i>T.gondii</i> IgG. Результатам необходимо уточнение через 15-25 дней.
$\geq 0,8$ и < 1.00	сомнительный	Эквивалентные результаты необходимо уточнить через 15-25 дней. Из такой же сыворотки определить IgM и IgG в <i>T.gondii</i>

<0,8	отрицательный	Если тест отрицательный для IgM, вероятно старая инвазия паразита
------	---------------	---

Установленный коэффициент делает возможным полуколичественную интерпретацию результатов для 2 сывороток одного и того же пациента. Сыворотка у которой установленный коэффициент между 0 и 2 соответствует границе положительного контроля.

8.5. Выявление и устранение неисправностей

Не валидированные или не воспроизводимые с высокой точностью часто являются следствием:

- Недостаточной промывки микроплат,
- Загрязнением отрицательных образцов сывороткой или плазмой с высоким титром антител,
- Загрязнение проявляющего раствора окисляющими агентами (гипохлорид натрия, ионы металлов...),
- Загрязнение закрепляющего раствора.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Диагностика недавней инфекции паразитом может быть установлена только на основании комбинации клинических и серологических данных. Результат единственного образца сыворотки не создает обоснованного доказательства для диагноза недавней инфекции. Только комбинация клинических и серологических данных (значительное увеличение в анти- *T. gondii* IgG титре антител в двух образцах сыворотки полученное при минимальном интервале в три недели и протестированные в одном повторе, присутствие анти- *T. gondii* IgM в значительном титре) позволяет диагностировать свежую инфекцию паразита. Необходимо определять анти- *T. gondii* IgM в течении беременности, так как IgG может появляться немного позднее по сравнению с IgM (Плателия™Токсо IgM ТМБ).

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие рабочие характеристики Плателии™Токсо IgA ТМБ были установлены в 3 различных местах используя образцы из эмбрионов, новорожденных и беременных женщин. Специфичность и чувствительность исследований выполнены на Плателии™Токсо IgA (ОПД) (72733) используя клинически документированные образцы с известным IgG и IgM серологическими результатами. Позднее было сделано сравнительное исследование между Плателии™Токсо IgA (ОПД) (72733) и Плателии™Токсо IgA ТМБ (72737).

Исследование специфичности

Исследование было сделано на 430 образцах из 405 пациентов в числе которых 23 образца из 21 эмбриона и 73 образца из 50 новорожденных не показывали биологических или клинических симптомов токсоплазмоза, 143 образца из пациентов с хронической инфекцией и 191 образец из неиммунизированных пациентов.

Общая специфичность этой популяции была 99,8% (429/430). В одном образце из новорожденного обнаружился сомнительный IgA, тогда как в отношении IgM был отрицательным

Исследование чувствительности

Исследование делалось на 287 образцах из 118 клинически известных пациентов.

- 13 образцов из 8 эмбрионов чьи матери заболели токсоплазмозом в течении беременности
- 187 образцов получены из 23 новорожденных чьи матери были инфицированы в течении беременности (1 место)
- 87 образцов из пациентов с острой инфекцией (45 1 место и 42 2 место)

IgA был определен в 4 случаях в 9 эмбрионах (присутствие IgA в эмбрионах зависит от даты материнской инфекции и забора эмбриональной крови. В новорожденных IgA был определен в 15 случаях при родах, в 2 случаях в матке и в 6 случаях через неделю после рождения. У 87 пациентов с острой инфекцией IgA был определен в 69 случаях.

Сравнительные исследования

Сравнительные исследования были сделаны между Плателии™Токсо IgA (ОПД) (72733) и Плателии™Токсо IgA ТМБ (72737) на 252 образцах из беременных женщин (отрицательных и положительных)

Результаты следующие:

Плателии™Токсо IgA (72733)	Плателии™Токсо IgA ТМБ (72737)			
	отрицательные	сомнительные	положительные	общие
отрицательные	212	0	0	212
сомнительные	1*	0	0	1
положительные	0	1*	38	39
общие	213	1*	38	252

*после контроля в обоих тестах для 2 образцов дали одинаковые результаты

ТОЧНОСТЬ

- **Воспроизводимость в пределах эксперимента**

3 положительных и 1 отрицательных образцы тестировались 30 раз в течении одного и того же анализа

Образец	Отрицательный	Положительный 1	Положительный 2	Положительный 3
	соотношение			
среднее	0,20	1,10	2,47	3,89
Ст. отклонение	0,03	0,04	0,06	0,10
Коеф. вариации	14,77	3,36	2,30	2,57

- **Воспроизводимость между анализами**

Каждый из четырех образцов (один отрицательный и 3 положительных) был протестирован в повторностях, два повтора в день за двадцатидневный период

Образец	Отрицательный	Положительный 1	Положительный 2	Положительный 3
	соотношение			
среднее	0,28	1,33	2,50	3,84
Ст. отклоне- ние	0,05	0,12	0,27	0,50
Коэф. вариаци и	17,75	8,98	10,61	12,99

ПЕРЕКРЕСНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

136 образцов известных как положительные для следующих показателей (ЦМВ, вирус Эбштейна-Барра, вирус герпеса, вирус везикулярного стоматита, вирус инфекционного паратита, корь, Rubella) и 39 образцов положительных для ревматоидного фактора, аутоиммунных антител и гетерофильных антител так же как и образцы из пациентов с миеломой были протестированы с ПлателииTMТоксо IgA ТМБ. Все образцы были найдены отрицательными (175/175).

11.ЛИТЕРАТУРА

См. английскую версию.



ПЛАТЕЛИЯ™ ТОКСО IgG

72840

96 тестов

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
IgG АНТИТЕЛ К *TOXOPLASMA GONDII*
В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ
ПЛАЗМЕ МЕТОДОМ
ИМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**



1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ПлателияTM Токсо IgG – непрямой Элиза иммунологический анализ для количественного определения IgG антител к *Toxoplasma gondii* в человеческой сыворотке или плазме.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

T. gondii – простейшее вызывающее инфекцию у многих видов млекопитающих и птиц. Токсоплазмоз часто встречающийся у человека и животных, наиболее типично не проявляет себя. Широкая распространенность этой инфекции в популяции, установленная с помощью серологических тестов, может отличаться в зависимости от страны происхождения и возраста. Токсоплазмоз в течении беременности влечет за собой серьезные врожденные аномалии (в частности нарушение функций мозга) и иногда мертворождение.

Проявление Токсо IgG антител у женщин до зачатия обеспечивает гарантию эмбриональной защиты от возможного токсоплазмоза в течении беременности. Предрасположение к тяжелой токсоплазмозной инфекции обычно у людей с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), или с другим ослаблением иммунитета. Эти инфекции в основном благодаря реактивации *T. gondii* цист присутствующих до ВИЧ инфекции. Специфическая диагностика *T. gondii* инфекции может быть усложненной, а изоляция паразита редка. Серологическое подтверждение *T. gondii* антител указывает на контакт с паразитом и становится широко распространенным как средство определения иммунного статуса и восприимчивости к инфекции. Поиск некоторых изотипов позволяет также датирование *T. gondii* и осуществление соответствующей терапии в случае свежей инфекции или предложение профилактических рекомендаций: рекомендации по гигиене и диете для беременных женщин, химиопрофилактика в популяции с ослабленным иммунитетом.

3. ПРИНЦИП

ПлателияTM Токсо IgG – тест для определения и титрования IgG антител к *Toxoplasma gondii* в человеческой сыворотке или плазме непрямым иммуноферментным методом Элиза.

T. gondii антитела используются для покрытия микроплат. Моноклональные антитела помеченные пероксидазой специфичные к человеческим гамма-цепочкам (анти- IgG) используются в качестве конъюгата. Тест использует следующие шаги:

• Шаг 1.

Образцы пациентов и калибраторы разбавляется 1/21 и затем раскапываются в лунки микроплата. В течении инкубации 1 час при 37⁰C, IgG антитела к *T. gondii* присутствующие в образце связываются с *T. gondii* антигеном, покрывающим лунки микроплата. После инкубации, не связанные не специфические антитела и другие белки сыворотки удаляются отмывкой.

- **Шаг 2.**

Конъюгат (пероксидаза маркирующая моноклональные антитела специфичные к человеческим гамма-цепочкам) добавляется в лунки микроплат. В течении инкубации 1 час при 37⁰С, маркированные антитела связываются с IgG сыворотки захваченными *T. gondii* антигеном. Не связанный антиген удаляется отмывкой в конце инкубации.

- **Шаг 3.**

Присутствие иммунокомплекса (*T. gondii* антиген, IgG антитела к *T. gondii*, анти- IgG конъюгат) деонстрируется добавлением в каждую лунку биокаталитического раствора.

- **Шаг 4.**

После инкубирования при комнатной температуре (+18-30⁰С), ферментативная реакция останавливается добавлением 1 N раствора серной кислоты.

Считываемая спектрофотометром при 450/620 нм оптическая плотность пропорциональна количеству антител к *T. gondii* присутствующим в образце и переводятся в МЕ/мл с использованием стандартной калибровочной кривой против международного стандарта ВОЗ ТОКС-М.

4. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

Поставляемое количество реагентов рассчитано на 96 тестов. Все реактивы исключительно для in vitro диагностики.

Маркировка		Природа реактива	Форма выпуска
R1	Микроплато	Микроплато: (готово к использованию): 12 стрипов с 8 соединенными лунками, покрытыми инактивированным <i>T. gondii</i> - антигеном	1
R2	Концентрированный отмывочный раствор (20×)	Концентрированный отмывочный раствор (20×): Трис-NaCl буфер (pH 7.4), 2% Твин® 20 Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	1×70 мл
R3	Калибратор 0	Калибратор 0: Отрицательная человеческая сыворотка к IgG антителам и отрицательная для гепатит В антигена, анти ВИЧ1, анти ВИЧ2 и	1×0,75 мл

		анти гепатит С. Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	
R4a	Калибратор 6	Калибратор 6 МЕ/мл: Человеческая сыворотка, вступающая в реакцию с IgG антителами к <i>T. gondii</i> и отрицательная для гепатит В антигена, анти ВИЧ1, анти ВИЧ2 и анти гепатит С. Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	1×0,75 мл
R4b	Калибратор 60	Калибратор 60 МЕ/мл: Человеческая сыворотка, вступающая в реакцию с IgG антителами к <i>T. gondii</i> и отрицательная для гепатит В антигена, анти ВИЧ1, анти ВИЧ2 и анти гепатит С. Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	1×0,75 мл
R4c	Калибратор 240	Калибратор 240 МЕ/мл: Человеческая сыворотка, вступающая в реакцию с IgG антителами к <i>T. gondii</i> и отрицательная для гепатит В антигена, анти ВИЧ1, анти ВИЧ2 и анти гепатит С. Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	1×0,75 мл
R6	Конъюгат (51×)	Конъюгат (51×): Мышечные моноклональные антитела к человеческим гамма-цепочкам связанные с пероксидазой хрена Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	1×0,7 мл
R7	Разбавитель	Разбавитель для образцов и конъюгата (готов к использованию): Трис-NaCl (pH 7,7), глицерол, 0,1% твин® 20, феноловый красный	1×80 мл

		Консервант: <1,5 % ProClin™ 300	
R9	Хромоген ТМБ	Хромоген (готов к использованию): 3,3,5,5'-тетраметилбензидин (<0,1%), H ₂ O ₂ (<1)	1×28 мл
R10	Стоп-раствор	Стоп-раствор (готов для использования) 1N раствор серной кислоты	1×28 мл
R		Клейкая пленка для планшет	4

Условия хранения и срок годности указаны на упаковке.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующей надлежащей лабораторной практики:

- Не используйте реактивы с истекшим сроком годности
- Не смешивайте и не объединяйте для одного анализа реактивы из разных партий.

ПРИМЕЧАНИЕ: Отмывочный раствор (R2, идентификационная этикетка 20× окрашенная зеленым цветом), хромоген (R9, идентификационная этикетка: ТМБ окрашенная бирюзовым цветом) и стоп-раствор (R10, наклеенный идентификатор: 1N окрашенная красным) возможно использовать из других партий, чем те, которые в наборе, при условии что эти реагенты строго эквивалентны партиям используемым в этом тесте.

ПРИМЕЧАНИЕ: недопустимо использовать разбавитель (R7) из других партий, чем предоставленная в наборе. Также недопустимо использовать разбавитель (R7) из наборов Плателия™ Токсо IgM (каталожный номер 72841).

ПРИМЕЧАНИЕ: В дополнение, отмывочный раствор (R2 идентификационная этикетка: 20× окрашенная зеленым цветом может смешиваться с двумя другими отмывочными растворами из различных наборов реагентов Био-Рад (R2 идентификационная этикетка: 10× окрашенная синим цветом или 10× окрашенная оранжевым цветом), когда правильно разведенная, в том случае, если только одна смесь используется при данной постановке теста.

- Перед использованием, подождать 30 минут чтобы дать реактивам достигнуть комнатной температуры (+18-30°C).
- Осторожно восстановите или разведите реагенты исключая контаминацию.

- Не проводите тест в присутствии паров реактивов (кислотных, щелочных, альдегидных паров) или пыли, которая может изменять ферментативную активность конъюгата.
- Используйте посуду вымытую и ополоснутую деионизованной водой или, что предпочтительно одноразовые материалы.
- Промывка микроплата – критический шаг в процедуре: следуйте рекомендованным количествам отмывочных циклов и удостоверьтесь, что все лунки полностью наполнены и полностью освобождены. Неправильная отмывка может приводить к неточным результатам.
- Не позволяйте микроплату высохнуть между концом отмывки и внесением реагента.
- Никогда не используйте какой-либо контейнер для внесения конъюгата и биокаталитического раствора.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к металлам или ионам металлов. Соответственно, не позволяйте каким-либо металлическим элементам входить в контакт с различными растворами, содержащими конъюгат или хромоген.
- Хромогенный раствор (R9) должен быть неокрашенным. Появление синего окрашивания показывает, что реактив не может быть использован и должен быть заменен.
- Используйте новые наконечники для пипеток для каждого образца.
- Проверяйте пипетки и другие инструменты для точных и правильных операций.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Материал человеческой природы, использованный для изготовления реагентов протестирован и найден не реактивным для гепатит В поверхностного антигена (HBs Ag), антител для вируса гепатита С (анти-ГЦВ) и вируса человеческого иммунодефицита (анти-ВИЧ 1 и нати ВИЧ 2). Так как нет метода, абсолютно гарантирующего отсутствие инфекционных агентов, использованные реагенты человеческой природы и образцы пациента как потенциально способные переносить инфекционные заболевания:

- Любой материал, включая отмывочный раствор, который напрямую контактировал с образцами и реагентами содержащими материалы человеческой природы должен считаться способным переносить инфекционные заболевания.
- Одевайте одноразовые перчатки, когда трогаете образцы и реагенты.
- Не пипетируйте ртом.

- Исключите проливание образцов или растворов, содержащих образцы. Проливание должно быть заливаться 10% раствором хлорамина. В случае пролива кислоты, сначала нейтрализовать бикарбонатом натрия, и затем вымыть с 10% раствором гипохлорид натрия и высушить фильтровальной бумагой. Материал, использованный для промывания должен быть удален в контейнер для контаминированных отходов.
- Образца пациентов, реактивы, содержащие материал человеческой природы, так же как и контаминированный материал и продукты должны выкидываться только после деконтаминации:
 - или погружением в белизну с конечной концентрацией 5% гипохлорида натрия в течении 30 минут,
 - или автоклавированием при 121°C минимум 2 часа.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Не вносить растворы, содержащие гипохлорид натрия, в автоклав.

- Исключите какой-либо контакт реактивов, включающих эти считающиеся не опасными с кожей или слизистой.
- Химические и биологические отходы должны собираться и выбрасываться в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.
- Все реактивы из набора исключительно для *in vitro* диагностического использования.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Некоторые реактивы содержащие ProClin™ <1,5 %

R43: Может вызывать чувствительность при контакте с кожей.

S28-37: После контакта с кожей немедленно промыть с большим количеством воды и мылом.. Одевать одноразовые перчатки.

6. ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка и плазма (ЭДТА, гепарин или цитрат) рекомендуется в качестве типовых образцов.
2. Соблюдайте следующие рекомендации для обращения, работы и хранения образцов крови:
 - Отбирайте все образцы крови соблюдая общепринятые меры предосторожности для венопункции.
 - Для сыворотки, дайте возможность образцам образовать тромб до центрифугирования.
 - Храните пробирки закрытыми все время.
 - После центрифугирования, отделите сыворотку и плазму от тромба или эритроцитов в герметично закрытых пробирках для хранения.

- Образцы могут храниться при $+2-8^{\circ}\text{C}$, если тест выполняется в течении 7 дней.
- Если тест не может быть завершен в течении 7 дней, или для перевозки, заморозить образцы при -20°C или холоднее.
- Не используйте образцы которые размораживались более чем 5 раз. Предварительно замороженные образцы должны быть тщательно перемешены (Вортекс) после оттаивания перед тестированием.

3. Образцы содержащие 90 г/л альбумина или 100 мг/л неконъюгированного билирубина, липемические образцы, содержащие эквивалент 36 г/л триолеина (триглицерида), и гемолизированные образцы содержащие до 10 г/л гемоглобина не оказывают влияния на результаты.

4. не нагревайте образцы.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

7.1. Необходимые, но не входящие в набор материалы

- Вортекс
- Микропланшетный ридер с 450 нм и 620 нм фильтрами (*)
- Термостат для микропланшет с температурой $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (*)
- Автоматический, полуавтоматический или ручной микропланшетный промыватель (*)
- Стерильная дистиллированная или деионизованная вода.
- Одноразовые перчатки.
- Защитные очки.
- Фильтровальная бумага.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или с установленным объемом, одно- или многоканальные пипетки, для измерения и внесения 10-1000 мкл, 1мл, 2 мл и 10 мл.
- Градуированные цилиндры емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1000 мл.
- Гипохлорид натрия (белизна) и бикарбонат натрия.
- Контейнер для биопасных отходов.
- Одноразовые пробирки.

(*) проконсультируйтесь в нашем техническом департаменте для детализации информации о рекомендуемом оборудовании.

7.2. Восстановление реагентов.

- **R1:** держите 30 минут при комнатной температуре (+18-30°C) до открывания пакета. Удалите защитное устройство, верните неиспользуемые стрипы в пакет немедленно и проверьте наличие влагопоглотителя. Осторожно запечатайте пакет и храните при +2-8°C.
- **R2:** Разведите 1/20 отмывочный раствор R2 в дистиллированной воде: например 50 мл R2 и 950 мл дистиллированной воды дадут готовый к использованию отмывочный раствор. Подготовить 350 мл разведенного отмывочного раствора для одного плата из 12 стрипов, если отмывка ручная.
- **R3, R4a, R4b, Rc:** Разведите 1/21 в разбавителе (R7) (например: 300 мкл R7 + 15 мкл калибратора).
- **R6+ R7:** Конъюгат (R6) концентрирован 51× и должен быть гомогенизирован перед использованием. Разведите 1/51 в разбавителе (R7). Для одного плата, разведите 0,5 мл конъюгата (R6) в 25 мл разбавителя (R7). Разделите эти объемы на 10 чтобы получить объем необходимый для одного стрипа.

7.3. Хранение и валидность открытых и/или восстановленных реагентов.

Набор должен храниться при +2-8°C. Когда набор хранится при +2-8°C перед открыванием, каждый компонент может использоваться до даты срока годности указанной на внешней этикетке набора.

- **R1:** Однажды открытые, стрипы остаются стабильными до 8 недель, если хранятся при +2-8°C в аккуратно закрыто пакете (проверяйте наличие влагопоглотителя).
- **R2:** Разведенный отмывочный раствор может храниться 2 недели при +2-30°C. Открытый концентрированный отмывочный раствор хранящийся при +2-30°C, при отсутствии контаминации, стабилен до срока годности указанного на этикетке.
- **R3, R4a, R4b, Rc, R6, R7:** Открытые и неконтаминированные реактивы хранящиеся при +2-30°C стабильны до 8 недель.
- **R6+ R7:** Разведенный рабочий раствор конъюгата стабилен 8 часов при комнатной температуре (+18-30°C) или 2 недели при +2-8°C.
- **R9:** Открытый неконтаминированный реактив, хранящийся при +2-8°C стабилен до 8 недель.
- **R10:** Открытый неконтаминированный реактив хранящийся при +2-8°C стабилен до даты, указанной на этикетке.

7.4. Процедура.

Строго следуйте процедуре анализа и надлежащей лабораторной практике. Перед использованием дайте реагентам достигнуть комнатной температуры.

(+18-30⁰C). Использование отрывающихся стрипов требует особенно внимания в течении работы. Используйте все калибраторы в каждой постановке чтобы валидировать результаты исследования.

1. Аккуратно установите план внесения и идентификации калибраторов и образцов пациентов.
2. Подготовьте разведенный отмывочный раствор (R2) (см. раздел 7.2.).
3. Снимите защитное устройство и выньте стрипы (R1) из защитного пакета (см. раздел 7.2.).
4. В индивидуальные идентифицированные пробирки, разведите калибраторы R3, R4a, R4b, R4c и образцы пациентов (S1, S2...) в разбавителе (R7) чтобы получить разведение 1/21: 300 мкл разбавителя (R7) и 15 мкл образца (см. раздел 7.2.). Перемешайте (Вортекс) разведенные образцы.
5. Строго следуя указанной ниже последовательности внесите в каждую лунку 200 мкл разведенных калибраторов и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5	S13									
B	R4a	S6										
C	R4b	S7										
D	R4c	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

6. Накройте микропланшет липкой пленкой, затем крепко прижмите, чтобы обеспечить прилипание. Сразу же инкубируйте микроплато в водяной бане термостатически контролируемой или в суховоздушном термостате 1 час ± 5 минут при 37⁰C ± 1⁰C.
7. До конца первого инкубационного периода, подготовьте рабочий раствор конъюгата (R6+ R7) (см. раздел 7.2.).
8. В конце первого инкубационного периода, удалите с платы липкую ленту. Удалите содержимое всех лунок в контейнер для биоотходов (содержащий раствор гипохлорита натрия). Промойте микроплато 4 раза с 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микроплато и

осторожно похлопайте по фильтровальной бумаге чтобы удалить оставшуюся жидкость.

9. Немедленно внесите 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+ R7) в каждую лунку. Раствор должен быть перемешан осторожно перед использованием.
10. Накройте микроплато липкой пленкой, затем крепко прижмите, чтобы обеспечить прилипание. Сразу же инкубируйте микроплато в водяной бане термостатически контролируемой или в суховоздушном термостате 1 час $\pm$ 5 минут при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
11. В конце второго инкубационного периода, удалите липкую пленку. Удалите содержимое всех лунок в контейнер для биоотходов (содержащий раствор гипохлорита натрия). Промойте микроплато 4 раза с 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микроплато и осторожно похлопайте по фильтровальной бумаге чтобы удалить оставшуюся жидкость.
12. Быстро внесите в каждую лунку и уберите со света по 200 мкл раствора хромогена (R9). Дайте реакции развиваться в темноте 30 ± 5 минут при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$). Не используйте липкую пленку для плат в течении инкубации.
13. остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора (R10) в каждую лунку. Используйте ту же последовательность и скорость внесения как для хромогенного раствора.
14. Осторожно вытрите нижнюю часть плат. Считайте оптическую плотность при 450/620 нм используя планшетный ридер в течении 30 минут после останавливающей реакции. До считывания стрипы должны всегда храниться без попадания света.
15. До сообщения результатов, проверьте соответствие между планом считывания и внесения образцов на плато.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Установление стандартной кривой.

Присутствие и количество IgG антител к *T. gondii* в тестируемом образце определяется сравнением оптической плотности (ОП) тестируемого образца в стандартном ряду. Плателия™ Токсо IgG исследование стандартизовано по международному стандарту ВОЗ ТОХ-М. Тем не менее, определенное расхождение титров может наблюдаться для некоторых сывороток. Когда они тестируются различными серологическими методами.

Эта разница благодаря факту, что *T. gondii* использованная в этих различных методах содержит различные пропорции растворимого мембранного антигена.

Постройте стандартную кривую [(ОП=функция (МЕ/мл)] нанося считанные ОП

калибраторов R3, R4a, R4b, R4c на вертикальную ось Y, затем откладывая их соответствующие концентрации в МЕ/мл на горизонтальную ось X. Для каждого тестируемого образца, рассчитайте анти-*T. gondii* IgG титр антител определением из построения стандартной кривой соответствующих концентраций к измеренным ОП.

NB: если считанная ОП тестируемого образца разведенного 1/21 > ОП R4c, этот тестируемый образец должен быть разведен 1/210 в R7 разбавителе и исследование повторено. Соответственные значения МЕ/мл должны затем умножаться на 10.

8.2. Контроль качества

Включайте все калибраторы для каждого микроплата и для каждого опыта и анализируйте полученные результаты. Для валидации исследования, следующие критерии должны сойтись:

- Значения оптической плотности
 - ОП R4a $\geq 0,2$
 - ОП R4b $\geq 0,4$
- Отношение оптических плотностей:
 - ОП R4a/ОП R3 $\geq 5,0$
 - ОП R4b/ОП R4a $\geq 2,2$
 - ОП R4c/ОП R4b $\geq 1,15$

Если эти критерии контроля качества не сходятся тест должен быть повторен.

8.3. Интерпретация результатов

Титр анти- <i>T. gondii</i> антител (МЕ/мл)	Результат	Интерпретация
Титр <6 МЕ/мл	Отрицательный	Отрицательный или сомнительный результат показывающий отсутствие приобретенного иммунитета, но не может исключить недавней инфекции. Если недавняя инфекция пациента заподозрена, второй образец должен исследоваться через две недели.
6 МЕ/мл $\geq$ титр <9 МЕ/мл	Сомнительный	
Титр ≥ 9 МЕ/мл	Положительный	Положительный результат обычно показывает прошедшую инфекцию. Тем не менее, недавняя инфекция не может быть исключена, особенно если антитела анти- <i>T. gondii</i> IgM

		присутствуют
--	--	--------------

Большие вариации титром могут наблюдаться при концентрациях выше 200 МЕ/мл.

8.4. Руководство по поиску ошибок

Не валидируемые или не повторяющиеся реакции могут часто вызываться:

- Неадекватной отмывкой микроплат.
- Загрязнением отрицательных образцов сыворотки или плазмы с высоким титром антител.
- Контаминация хромогенного раствора химическими окислительными агентами (гипохлорид натрия, ионы металлов...).
- Контаминация стоп-раствора.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Характеристики ПлателияTM Токсо IgG были оценены в двух местах используя суммарно 1310 образцов от беременных женщин и доноров крови. В одном месте сравнительные исследования были выполнены с использованием ПлателияTM Токсо IgG ТМБ (72741) ручным способом. Во втором месте характеристики ПлателияTM Токсо IgG были получены в сравнении с ПлателияTM Токсо IgG ТМБ (72741) на автоматизированном EIA микропланшетном анализаторе.

9.1. Широта распространения

Широта распространения анти-Toxoplasma gondii IgG антител использованием ПлателияTM Токсо IgG была оценена на панели из 538 образцов в основном из беременных женщин наблюдаемых в течении их беременности из округа Парижа (Франция). 128 образцов были положительны для анти-токсоплазма IgG антител. Широта распространения измерялась ПлателияTM Токсо IgG признается 23,8% (128/538).

9.2. Сравнительное исследование (Место 1)

Характеристика ПлателияTM Токсо IgG была получена на панели из 745 образцов, сгруппированных следующим образом:

- 606 сывороток от доноров крови
- 139 сывороток от беременных женщин

Результаты сравнивались с результатами полученными с использованием ПлателияTM Токсо IgG ТМБ (72741) использованной в качестве стандарта.

		Плателия™ Токсо IgG ТМБ (72741)			
		Отрицательный	Сомнительный*	Положительный	Суммарный
Плателия™ Токсо IgG ТМБ (72840)	Отрицательный	365	0	0	365
	Сомнительный*	0	2	0	2
	Положительный	0	0	378	378
	Суммарный	365	2	365	745

- Общее соответствие: 743/743 100,0% [IC 95%=99,5%-100,0%]
- Относительная специфичность: 365/365 100,0% [IC 95%=99,0%-100,0%]
- Относительная чувствительность: 378/378 [IC 95%=99,0%-100,0%]

* Сомнительные образцы не были включены в чувствительность, специфичность и соответствующие расчеты.

[IC95%]=95% доверительный интервал

9.3. Характеристики (Место 2)

Перспективные исследования проведены на 538 образцах в основном от беременных женщин, наблюдаемых в течении их беременности и тестированных в традиционной лаборатории. Эти образцы тестировались в параллели методами Плателия™ Токсо IgG и Плателия™ Токсо IgG ТМБ (72741). Кроме того, все образцы от неизвестных пациентов из лабораторной базы данных и имеющие итр ниже 100 МЕ/мл контролировались вторым методом:

- Чувствительная агглютинация (Лабораторный антиген: *T. gondii*, RH штамм) для сывороток с титром > 10 МЕ/мл.
- Непрямая иммунофлюоресценция (лабораторный антиген: *T. gondii*, RH штамм) для сывороток с титром 3-10 МЕ/мл.

Результаты сравнивались с полученными с помощью Плателия™ Токсо IgG ТМБ (72741) использованной в качестве стандарта.

		Плателия™ Токсо IgG ТМБ (72741)			
		Отрицательный	Сомнительный*	Положительный	Суммарный
Плателия™ Токсо IgG ТМБ (72840)	Отрицательный	406	1	0	407
	Сомнительный*	3	0	0	3
	Положительный	7	10	111	128
	Суммарный	416	11	111	538

- Общее соответствие: 517/524 98,7% [IC 95%=97,3%-99,5%]
- Относительная специфичность: 406/413 98,3% [IC 95%=96,5%-99,3%]
- Относительная чувствительность: 111/111 100,0% [IC 95%=96,8%-100,0%]

* Сомнительные образцы не были включены в чувствительность, специфичность и соответствующие расчеты.

[IC95%]=95% доверительный интервал

7 противоречивых положительных образца исследованных с Плателией™ Токсо IgG все были подтверждены положительными дополнительными методами использованными в лаборатории (чувствительная агглютинация, непрямая иммунофлюоресценция).

В дополнение, 9 сероконверсионных панелей, включающих 3 образца каждая были также протестированы с Плателией™ Токсо IgG (72840) и Плателией™ Токсо IgG ТМБ (72741). Для каждой панели, первый образец был отрицательным для обоих анти-*Toxoplasma gondii* IgG и IgM антител.

В 8 из 9 сероконверсионных панелях, оба исследования дали сходные результаты. В одной панели, 2-я сероконверсионная сыворотка была обнаружена положительной с Плателией™ Токсо IgG, но сомнительной с Плателией™ Токсо IgG ТМБ.

9.4. Перекрестная реактивность

Панель из 197 образцов включающая 159 положительных образцов для краснухи, ЦМВ, ЭБВ, ВПГ, ВВО, Мампс, кори и вируса иммунодефицита человека и 38 положительных образцов для ревматоидного фактора, авто-

антител и гетерофильных антител была протестирована с ПлателияTM Токсо IgG (72840) и ПлателияTM Токсо IgG ТМБ (72741).

141 образец был найден негативным, 55 образца были обнаружены позитивными и 1 образец был найден сомнительным с ПлателияTM Токсо IgG. Все положительные образцы были обнаружены позитивными с ПлателияTM Токсо IgG ТМБ.

9.5. Воспроизводимость

- Воспроизводимость в ходе анализа (повторяемость):

Для того чтобы определить повторяемость в пределах исследования, один отрицательный и два положительных образца были протестированы 32 раза в течении одного анализа. Концентрация (МЕ/мл) определялась для каждого образца). Средние концентрации (МЕ/мл), стандартное отклонение (СО) и коэффициент вариации (% КВ) для каждого образца приведены ниже в таблице.

Воспроизводимость в ходе анализа (повторяемость).

N=32	Отрицательный образец	Низко положительный образец	Положительный образец	Высоко положительный образец
	Концентрация (МЕ/мл)			
Среднее	0,15	16,0	39,8	167,5
СО	0,01	2,3	2,7	23.1
% КВ	7,2%	14,4%	6,9%	13,8%

- Воспроизводимость между анализами (воспроизводимость)

Для того чтобы проверить воспроизводимость между анализами, четыре образца (один отрицательный и три положительных) тестировались в повторах в две постановки анализа в день в течении 20 дневного периода. Концентрация (МЕ/мл) определялась для каждого образца. Среднее значение концентраций (МЕ/мл), стандартное отклонение (СО) и коэффициент вариации (%КВ) для каждого образца приведены ниже в таблице:

Воспроизводимость между анализами (воспроизводимость).

N=80	Отрицательный образец	Низко положительный образец	Положительный образец	Высоко положительный образец
	Концентрация (МЕ/мл)			
Среднее	0,15	15,2	41,7	166,5
СО	0,05	2,4	4,2	21,0
% КВ	32,6%	15,5%	10,1%	12,6%

9.6. Точность и линейность

Для того чтобы проверить точность калибровки, несколько разведений международного стандарта ВОЗ ТОХ-М тестировались. Получены результаты демонстрируют, что ПлателияTM Токсо IgG точно калибрована против международного стандарта ВОЗ ТОХ-М для значений до 30 МЕ/мл. Более 30 МЕ/мл, полученные результаты не соответствуют номинальным около 25-50 %. Используя серийные разведения 5 положительных образцов, исследуемый ряд ПлателияTM Токсо IgG был установлен между 7 и 200 МЕ/мл.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Диагноз инфекции *T. gondii* может быть получен на основании комбинации клинических и биологических данных. Результат отдельного теста титрования анти-*T. gondii* IgG антител не дает достаточного количества доказательств для диагностики недавней инфекции *T. gondii*.

- Диагностика недавней инфекции может быть сделана только с полной информацией о пациенте включая клинические и биологические данные (значительное увеличение анти- *T. gondii* IgG антител на двух сыворотках пациентов вычертилось в 3-х недельном интервале и тестировалось при остановке одного анализа. Присутствие анти-*T. gondii* IgM в значительном уровне, демонстрация низкой анти-*T. gondii* IgG авидности).
- Присутствие анти-*T. gondii* IgM антител не составляет достаточного доказательства для подтверждения недавней инфекции, потому что IgM может сохраняться несколько месяцев или даже лет после инфекции. Когда IgM определяется, количественное определение анти-*T. gondii* IgG

антител должно выполняться так же как и последующее наблюдение за ростом анти-*T. gondii* антител по крайней мере на повторных сыворотках отобранных через 3 недели.

- Если образец тестировался слишком рано в течении недавней первичной инфекции, анти-*T. gondii* IgM антитела могут еще не присутствовать. Если существует подозрение, повторный образец должен быть отобран тремя неделями позже для повторного IgM тестирования.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все произведенные реагенты подготавливаются в соответствии с нашей системой качества, начиная с приемки сырого материала до коммерциализации конечного продукта. Каждая выпущенная партия подвергается контролю качества и выпускается на рынок только после подтверждения предписанных приемочных критериев. Протоколы производства и контроля каждой отдельной партии хранятся в Био-Рад.

11. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. французскую версию.

Токсоплазма IgM

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА PLATELIA™ TOXO IgM 72841

96 тестов

Качественное определение антител IgM к токсоплазме (*Toxoplasma gondii*) в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

1. ПРИМЕНЕНИЕ

Platelia™ Toxo IgM является диагностической системой для качественного определения антител IgM к *T. gondii* в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного твердофазного анализа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

T. gondii относится к протозойным микроорганизмам, вызывающим инфекционное заболевание у большого количества видов млекопитающих и птиц. Токсоплазмоз часто встречается у человека и животных и обычно протекает скрыто. Распространенность этой инфекции в популяции по данным серологических исследований может варьировать в зависимости от места проживания и возраста.

Установлено, что у беременных женщин токсоплазмоз приводит к серьезным врожденным порокам развития плода (в частности, к нарушению функций головного мозга), а иногда и к мертворождению. Определение антител IgG к *T. gondii* у женщин до зачатия позволяет защитить будущий плод от возможного токсоплазмоза во время беременности.

Предрасположенность к тяжелому течению токсоплазмоза типична для людей с синдромом приобретенного иммунодефицита человека (СПИД), а также для иммунологически скомпрометированных лиц. В большинстве случаев заболевание возникает из-за реактивации цист токсоплазмы, имевшихся в организме до начала ВИЧ-инфекции.

Специфическая диагностика инфекции, вызываемой *T. gondii*, бывает затруднена, и выделить паразита удается редко. Серологическое подтверждение наличия антител к токсоплазме говорит о присутствии возбудителя и сейчас широко применяется для определения иммунного ответа и восприимчивости к данной инфекции.

Скрининг ряда серотипов позволяет установить момент контакта с возбудителем и провести надлежащее лечение при остром токсоплазмозе, либо предложить профилактические рекомендации: основы гигиены и питания беременных, химиопрофилактику для иммунологически скомпрометированного населения.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Platelia™ Toxo IgM представляет собой является диагностической системой для качественного определения антител IgM к токсоплазме в сыворотке и плазме крови человека при помощи иммуноферментного анализа с захватом IgM на твердой фазе.

Антитела к μ -связям человека сорбированы на твердой фазе (лунки микропланшета). Состав из антигенов токсоплазмы и моноклональных антител к антигенам *T. gondii*, меченных пероксидазой используется в качестве конъюгата.

Диагностика проводится в следующем порядке:

- **Этап 1**

Образцы пациентов и калибратор и контроли разводят 1/21 и затем наносят в лунки микропланшета. Во время инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C антитела IgM, имеющиеся в образце, связываются с антителами к μ -связям человека, фиксированными на лунках микропланшета. По окончании инкубации IgG вместе с другими сывороточными белками удаляют промывками.

- **Этап 2**

Конъюгат (смесь антигенов *T. gondii* и меченных пероксидазой моноклональных антител к антигенам токсоплазмы) вносят в лунки микропланшета. При инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C конъюгат связывается со специфическими антителами IgM к токсоплазме, которые оказались фиксированными на микропланшете. Несвязанный конъюгат удаляют промывками по окончании инкубации.

- **Этап 3**

Наличие иммунных комплексов (антитела к μ -связям человека/IgM к *T. gondii*/антигены *T. gondii* /моноклональные антитела к *T. gondii*, меченные пероксидазой) подтверждают добавлением ферментативного рабочего раствора в каждую лунку.

- **Этап 4**

После инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) ферментативную реакцию прерывают при помощи добавления 1N раствора серной кислоты. Оптическая плотность, полученная на спектрофотометре в диапазоне 450/620 нм, пропорциональна содержанию антител IgM к токсоплазме в образце сыворотки.

4. ОПИСАНИЕ НАБОРА

Набор реактивов рассчитан на проведение 96 тестов. Все реактивы предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

	Наименование	Химический состав реактива	Форма выпуска
R1	Микропланшет:	Микропланшет: (готовый к использованию): 12 стрипов с 8 отламываемыми лунками, покрытыми антителами к μ -связям человека.	1
R2	Концентрированный промывочный раствор (20х концентрат)	Концентрированный промывочный раствор (20х концентрат): трис-NaCl-буферный раствор (pH 7.4), 2% Твин® 20 Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 70 мл
R3	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль: отрицательная человеческая сыворотка по антителам IgM к <i>T. gondii</i> , отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R4	Калибратор	Калибратор: человеческая сыворотка положительная по антителам IgM к <i>T. gondii</i> , отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R5	Положительный контроль	Положительный контроль: положительная человеческая сыворотка по антителам IgM к <i>T. gondii</i> , отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R6a	Антиген	Антигены <i>T. gondii</i>: Лиофилизированные антигены <i>T. gondii</i> . Консервант : < 1.5% ProClin™ 300	4 x qs 8.0 мл

R6b	Конъюгат (101х концентрат)	Конъюгат (101х концентрат): Мышинные моноклональные антитела к <i>T. gondii</i> (P30), меченные пероксидазой. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.4 мл
R7	Растворитель	Растворитель для образцов и конъюгата (готовый к использованию): трис-NaCl-буферный раствор (pH 7.7), бычий сывороточный альбумин, 0.1% Твин® 20, фенол красный. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 80 мл
R9	Хромоген ТМБ	Хромоген (готовый к использованию): 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (< 0.1%), H ₂ O ₂ (<1%).	1 x 28 мл
R10	Стоп-реагент	Стоп-реагент (готов к использованию): 1N раствор серной кислоты	1 x 28 мл
		Материал для запечатывания микропланшетов	4

Условия хранения и срок годности, см. на упаковке.

5. ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от строгого соблюдения следующих стандартов «Надлежащей лабораторной практики»:

- Не используйте просроченные реактивы.
- Не смешивайте и не используйте во время одного исследования реактивы из разных партий.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Для промывочного раствора (маркировка R2: 20х концентрат, зеленого цвета), хромогена (маркировка R9: ТМБ бирюзового цвета) и стоп-реагента (маркировка R10: 1N красного цвета) допустимо использовать не только те партии реактивов, которые входят в набор, при условии, что используемые реактивы будут строго эквивалентны и в ходе одного исследования будут взяты из одного и того же комплекта.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Промывочный раствор (маркировка R2: 20х концентрат, зеленого цвета) допустимо смешивать с двумя другими промывочными растворами из различных наборов реактивов компании «Био-Рад» (маркировка R2: 10х концентрат голубого цвета или 10х концентрат оранжевого цвета). При этом растворы должны быть надлежащим образом восстановлены, и в ходе одного исследования их можно смешивать только один раз.

- Перед использованием подождите 30 минут для того, чтобы реактивы нагрелись до комнатной температуры (+18-30°C).
- Аккуратно восстанавливайте и разводите реактивы, избегая попадания каких-либо примесей.
- Не проводите исследование в присутствии химически активных паров (пары кислот, щелочей, альдегидов) и пыли, которые могут изменить активность ферментов в составе конъюгата.

- Используйте стеклянные емкости, тщательно вымытые и промытые деионизированной водой, однако предпочтительнее использовать одноразовый материал.
- Промывка микропланшета является решающим этапом исследования: соблюдайте рекомендуемое количество промывок и проверяйте, чтобы все лунки вначале были полностью заполнены, а затем полностью опорожнены. Ненадлежащая промывка может привести к ложным результатам.
- Следите за тем, чтобы поверхность микропланшета не высыхала в промежутке между промывкой и внесением реактивов.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для внесения конъюгата и ферментативного раствора.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к примесям металлов и их ионам. Поэтому не допускайте контакта металлических предметов с любыми растворами, содержащими конъюгат или хромоген.
- Раствор хромогена (R9) должен быть бесцветным. Появление синего оттенка говорит о том, что реактив использовать нельзя и следует заменить.
- Используйте новый наконечник дозатора для каждого образца сыворотки.
- Проверяйте исправность дозаторов и другого инструментария.

ИНСТРУКЦИИ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Компоненты человеческого материала, используемые в составе реактивов, были проверены и являются отрицательными к наличию поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антител к гепатиту С (HCV) и к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ1 и ВИЧ2). Однако, поскольку ни один метод не может абсолютно гарантировать отсутствие инфекционных возбудителей, работайте с реактивами человеческого происхождения и с образцами сыворотки пациентов как с возможными источниками инфекционных заболеваний:

- Любой материал, в том числе и промывочные растворы, непосредственно контактирующий с образцами сыворотки и реактивами, содержащими человеческий материал, должен рассматриваться как возможный источник инфекции.
- Работайте с реактивами и образцами в одноразовых перчатках.
- Не набирайте реактивы в дозатор ртом.
- Старайтесь не разливать образцы и растворы с сывороткой. Пролитую жидкость необходимо смыть осветлителем, разведенным до 10 %. Если пролилась кислота, ее следует вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем очистить 10% раствором осветлителя и просушить поверхность фильтровальной бумагой. Материал, использованный для очистки, утилизируется в контейнер для загрязненных отходов.
- Образцы сыворотки пациентов, реактивы, содержащие человеческий материал, а также загрязненный материал и вещества должны быть утилизированы только после обеззараживания:
 - либо погружением в осветлитель с итоговой 5 % концентрацией гипохлорита натрия на 30 минут.
 - либо при помощи автоклавирования при температуре 121°C в течение минимум 2 часов.

ОСТОРОЖНО: не ставьте в автоклав растворы, содержащие гипохлорит натрия.

- Избегайте попадания реактивов, в том числе и тех, которые считаются безопасными, на кожу и слизистые оболочки.
- Работать с химическими и биологическими отходами, а также проводить их утилизацию необходимо в соответствии со стандартами «Надлежащей лабораторной практики».

- Все реактивы в наборе предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

Осторожно:



Xi - Irritant

Некоторые реактивы содержат консервант ProClin™ 300 < 1.5%

R43: При контакте с кожей может вызвать раздражение.

S28-37: При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды с мылом. Работайте в специальных перчатках.

6. ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка и плазма крови (этилендиаминтетрауксусная кислота, гепарин, цитрат) являются рекомендуемыми типами образцов.
2. При работе с образцами крови, их исследовании и хранении соблюдайте следующие рекомендации:
 - Забор образцов крови осуществляйте с соблюдением стандартных мер предосторожности при венепункции.
 - Дождитесь завершения тромбообразования в сыворотке перед центрифугированием.
 - Всегда держите пробирки закрытыми.
 - После центрифугирования отделите сыворотку или плазму от тромба или эритроцитов в плотно закрывающуюся пробирку для хранения.
 - При проведении анализа не позднее, чем в течение 7 дней, образцы можно хранить при температуре +2-8°C.
 - Если в течение 7 дней анализ проведен не был, а также для транспортировки, образцы замораживают при температуре -20°C и ниже.
 - Не используйте образцы, размороженные более 5 раз. После того, как замороженные образцы оттаяли, перед постановкой исследования их необходимо тщательно перемешать (при помощи вортекса).
3. Образцы с содержанием альбумина до 90 г/л или неконъюгированного билирубина до 100 мг/л, образцы с содержанием липидов, эквивалентных 36 г/л триолеина (триглицерида), а также гемолизированная сыворотка с гемоглобином до 10 г/л не влияют на результат.
4. Не нагревайте образцы.

7. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

7.1 Дополнительные материалы, не входящие в комплект

- Центрифуга/вортекс.
- Автоматический считыватель для микропланшета с фильтрами 450 нм и 620 нм (*).
- Инкубатор для микропланшета с термостатом, настроенным на 37±1°C (*).
- Автоматический, полуавтоматический или ручной промывочный аппарат для микропланшета (*).
- Стерильная дистиллированная или деионизированная вода.
- Одноразовые перчатки.
- Лабораторные или защитные очки.
- Фильтровальная бумага.

- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или с заданными параметрами дозаторы или мультидозаторы для дозирования и разведения объемов от 10 мкл до 1000 мкл, а также 1 мл, 2 мл и 10 мл.
- Мензурки емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1000 мл.
- Натрия гипохлорит (осветлитель) и натрия бикарбонат.
- Контейнер для биологически опасных отходов.
- Одноразовые пробирки.

(*) Для получения дополнительной информации по рекомендованному оборудованию Вы можете связаться с нашей технической службой.

7.2 Восстановление реактивов

- **R1:** Перед тем, как открыть контейнер, оставьте его на 30 минут при комнатной температуре (+18-30°C). Выньте рамку-держатель, сразу же положите обратно в контейнер неиспользуемые стрипы и проверьте, чтобы там был влагопоглотитель. Тщательно запечатайте контейнер и поместите его на хранение при температуре +2-8°C.
- **R2:** Разведите промывочный раствор R2 в дистиллированной воде 1/20 (например, 50 мл R2 и 950 мл дистиллированной воды), чтобы получить готовый к использованию промывочный раствор. Подготовьте 350 мл разведенного промывочного раствора на один 12-стриповый микропланшет для ручной промывки.
- **R3, R4, R5:** разведите 1/21 Раствором для разведения (R7) (пример: 300 мкл R7 + 15 мкл Калибратора или Контроля).
- **R6a:** Лиофилизированные Антигены *T. gondii*. Для 6 стрипов восстановите 1 флакон лиофилизированных антигенов, добавив 14 мл Растворителя (R7). Тщательно перемешайте. После разведения раствор антигенов (R6a+R7) должен быть абсолютно прозрачным.
- **R6 (R6a+R6b):** Рабочий раствор конъюгата: добавьте 140 мкл конъюгата (R6b) в каждый флакон восстановленных антигенов *T. gondii* (разведенный R6a). Тщательно перемешайте. Рабочий раствор конъюгата необходимо восстановить как минимум за 1 час до использования.

7.3 Хранение и срок годности открытых и/или восстановленных реактивов.

Набор реактивов следует хранить при температуре +2-8°C. При хранении набора при температуре +2-8°C все реактивы можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке на упаковке набора.

- **R1:** После вскрытия упаковки стрипы остаются стабильными в течение 8 недель при хранении при температуре +2-8°C в той же плотно закрытой упаковке (проверьте наличие влагопоглотителя).
- **R2:** После разведения Промывочный раствор можно хранить 2 недели при температуре +2-30°C. После вскрытия концентрированный Промывочный раствор, хранящийся при +2-30°C и без примесей остается устойчивым до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- **R3, R4, R5, R6b, R7:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при температуре +2-8°C реактивы остаются стабильными до 8 недель.
- **R6 (R6a+R6b):** После разведения рабочий раствор конъюгата остается стабильным до 8 часов при комнатной температуре (+18-30°C) или в течение 2 недель при температуре +2-8°C.

- **R9:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при +2-8°C реактив остается стабильным до 8 недель.
- **R10:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при +2-8°C реактив остается стабильным до истечения срока годности, указанного на этикетке.

7.4 Порядок работы

Строго соблюдайте порядок химического анализа, а также стандарты «Надлежащей лабораторной практики».

Перед использованием реактивы должны нагреться до комнатной температуры (20 - 30°C).

При отламывании и работе с лунками соблюдайте особую аккуратность. Используйте калибратор и контроли при каждой постановке анализа для подтверждения результатов исследования.

1. Внимательно составьте план распределения и маркировки калибратора, контролей и образцов сыворотки пациентов.
2. Подготовьте разведение Промывочного раствора (R2) [см. Раздел 7.2].
3. Выньте рамку-держатель и стрипы (R1) из защитной упаковки [см. Раздел 7.2].
4. Подготовьте Рабочий раствор конъюгата R6 (R6a+R6b) [см. Раздел 7.2].
5. В индивидуально промаркированных пробирках разведите Калибратор (R4), Контроли (R3, R5) и образцы пациентов (S1, S2...) при помощи Растворителя (R7) до концентрации 1/21: 300 мкл Растворителя (R7) и 15 мкл образца. Перемешайте при помощи вортекса разведенные образцы.
6. Строго соблюдайте указанную ниже последовательность, вносите в каждую ячейку по 200 мкл разведенного калибратора, контролей и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5	S13									
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

7. Накройте микропланшет адгезионным материалом, плотно прижмите, чтобы обеспечить герметичность. Сразу же поставьте микропланшет в водный термостат или в суховоздушный инкубатор на 1 час $\pm$ 5 минут при 37°C $\pm$ 1°C.

8. По окончании первой инкубации снимите адгезионный материал и аспирируйте содержимое из всех лунок в контейнер для биологически активных отходов (содержащий натрия гипохлорит). Промойте микропланшет 4 раза 350 мкл Промывочного раствора (R2). Переверните планшет и, аккуратно постукивая по фильтровальной бумаге, стряхните остатки реагентов.

9. Сразу же добавьте 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) во все лунки. Перед использованием раствор следует аккуратно взболтать.

10. Накройте микропланшет адгезионным материалом, плотно прижмите, чтобы обеспечить герметичность. Сразу же поставьте микропланшет в водный термостат или в суховоздушный инкубатор на 1 час $\pm$ 5 минут при 37°C $\pm$ 1°C.

11. По окончании второй инкубации снимите адгезионный материал и аспирируйте содержимое из всех лунок в контейнер для биологически активных отходов (содержащий натрия гипохлорит). Промойте микропланшет 4 раза 350 мкл Промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и, аккуратно постукивая по фильтровальной бумаге, стряхните остатки реагентов.

12. Быстро (**не на свету**) распределите в каждую лунку по 200 мкл Раствора хромогена (R9). **Реакция должна проходить в темноте в течение 30 ± 5 минут при комнатной температуре (+18-30°C).** При данной инкубации адгезионный материал не используется.

13. Остановите ферментативную реакцию, добавив 100 мкл стоп-реагента (R10) в каждую лунку. Придерживайтесь той же последовательности и схемы распределения как и для ферментативного раствора.

14. Тщательно протрите рабочую поверхность сканера. На спектрофотометре определите оптическую плотность в диапазоне 450/620 нм в течение 30 минут после остановки реакции. Перед считыванием стрипы необходимо все время держать в темноте.

15. Перед описанием результатов проверьте, соответствуют ли друг другу данные считывания и схемы сканера и распределения образцов.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Вычисление порогового значения (ПЗ)

Пороговое значение (ПЗ) соответствует среднему значению показателей оптической плотности (ОП) пороговых значений повторов Контроля (R4):

$$\text{ПЗ} = \text{среднее ОП R4.}$$

8.2 Вычисление коэффициента отношения образца

Результат образца выражается через коэффициент отношения по следующей формуле:

$$\text{Коэффициент отношения} = \text{ОП образца} / \text{ПЗ образца}$$

8.3 Контроль качества

Процедура включает калибратор и контроли для каждого микропланшета для каждой постановки теста и анализ полученных результатов. Для верификации исследования должны быть соблюдены следующие критерии:

- Показатели оптической плотности:

$$\text{ПЗ} \geq 0.300$$

$$0.80 \times \text{ПЗ} < \text{ОП R4 повтор 1} < 1.20 \times \text{ПЗ}$$

$$0.80 \times \text{ПЗ} < \text{ОП R4 повтор 2} < 1.20 \times \text{ПЗ}$$

(Показатель ОП каждой пробы порогового значения контроля (R4) не должен отличаться более, чем на 20% от порогового значения).

- Коэффициенты отношения оптической плотности:

$$\text{Коэффициент отношения R3 (ОП R3 / ПЗ)} \leq 0.30$$

$$\text{Коэффициент отношения R5 (ОП R5 / ПЗ)} \geq 1.80$$

Если результат не соответствует данным критериям контроля качества, исследование следует повторить.

8.4 Интерпретация результатов

Коэффициент отношения	Результат	Интерпретация
Коэффициент < 0.80	Отрицательный	Образец считается химически неактивным в отношении наличия

		антител IgM к <i>T. gondii</i> .
$0.80 \leq \text{Коэффициент} < 1.00$	Сомнительный	Образец считается сомнительным в отношении наличия антител IgM к <i>T. gondii</i> . Результат следует подтвердить, взяв повторный анализ минимум через 3 недели после первого обследования.
Коэффициент ≥ 1.00	Положительный	Образец считается химически активным в отношении наличия антител IgM к <i>T. gondii</i> .

8.5 Поиск и устранение ошибок

Недостовверные реакции или реакции с низкой повторяемостью обычно происходят в результате:

- Ненадлежащей промывки микропланшета.
- Попадания в отрицательные образцы примесей сыворотки или плазмы с высоким титром антител.
- Попадания в ферментативный раствор химических окислителей (осветлитель, ионы металлов...).
- Попадания примесей в раствор стоп-реагента.

9. ЭКСПЛУАТАЦИЯ

Эксплуатация диагностической системы Platelia™ Тохо IgM осуществлялась на 2 базах, и всего было обработано 863 образца, взятых у беременных женщин и доноров крови.

9.1 Распространенность

Распространенность антител IgM оценивалась при помощи Platelia™ Тохо IgM по выборке из 500 образцов, взятых у беременных женщин. 15 образцов оказались положительными по наличию антител IgM к токсоплазме. По данным исследования с Platelia™ Тохо IgM распространенность составила 3% (15/500).

9.2 Специфичность

Специфичность оценивалась по выборке из 737 образцов, отрицательных по данным Platelia™ Тохо IgM TMB (72751), на 2 базах во Франции:

- 154 образца сыворотки доноров крови
- 583 образца сыворотки беременных женщин

Исследуемые группы / база		Кол-во образцов	Отрицательный	Сомнительный	Положительный	Специфичность
База 1	Беременные женщины	102	102	0	0	100.0% (102/102) [97.1%-100%]
	Доноры крови	154	154	0	0	100.0% (154/154) [98.1%-100%]
База 2	Беременные женщины	481	480	1	0	99.8% (480/481) [99.8%-99.9%]
Всего		737	736	1	0	99.9% (736/737)

					[99.25%-100%]
--	--	--	--	--	----------------------

**Сомнительные результаты расценивались как положительные при определении специфичности.
[ДИ 95%] = доверительный интервал 95%.*

9.3 Чувствительность

Чувствительность оценивалась по выборке из 69 образцов, положительных по данным Platelia™ Toxo IgM TMB (72751), на 2 базах во Франции:

- 4 образца сыворотки доноров крови
- 65 образцов сыворотки беременных женщин

		Platelia™ Toxo IgM TMB (72751)		
		Сомнительный	Положительный	Всего
Platelia™ Toxo IgM TMB (72751)	Отрицательный	0	0	0
	Сомнительный*	8	0	8
	Положительный	1	60	61
	Всего	9	60	69

Относительная чувствительность: 69/69 100,0% [ДИ 95% = 94,8% - 100,0%]

**Сомнительные результаты расценивались как положительные при определении чувствительности.
[ДИ 95%] = доверительный интервал 95%.*

Один несовпадающий положительный по данным Platelia™ Toxo IgM образец был проверен методом иммуносорбентной агглютинации (ISAGA) и также интерпретирован как положительный. Дополнительно было проверено 57 образцов из выборки 19 сероконверсий. Из этих 19 сероконверсий для 18 были получены сопоставимые результаты и только в одном случае произошло расхождение в пользу эталонного метода диагностики.

9.4 Перекрестная реактивность

Исследование на выявление антител IgM к токсоплазме с помощью Platelia™ Toxo IgM и другого, имеющегося в продаже, набора для ИФА проводилось по выборке из 205 образцов, включая 167 образцов, положительных по ЦМВ, вирусу краснухи, ЭБВ, вирусу герпеса, вирусу Варицелла-Зостер, эпидемическому паротиту, кори и ВИЧ, а также 38 положительных образцов по ревматоидному фактору, аутоантителам, гетерофильным антителам и миеломной болезни.

Среди этих образцов 2 оказались положительными и совпадающими с данными другого набора для ИФА: 1 образец, положительный по антителам IgG к ЭБВ, и 1 образец, положительный по антителам IgG к вирусу герпеса II типа.

9.5 Точность

- Внутриааналитическая сходимость (повторяемость)

Для оценки повторяемости химического анализа один отрицательный и три положительных образца были протестированы 32 раза в ходе одного исследования. Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца) определяли для каждого образца. Ниже приведено среднее значение коэффициента отношения, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) для каждого образца:

Внутриааналитическая сходимость (повторяемость)

N=32	Отрицательные образцы	Слабо положительные образцы	Положительные образцы	Резко положительные образцы
------	-----------------------	-----------------------------	-----------------------	-----------------------------

Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца)				
среднее	0.05	1.92	3.23	4.49
SD	0	0.04	0.07	0.10
% CV	5.0%	2.1%	2.3%	2.3%

- Межаналитическая сходимость (воспроизводимость)

Для оценки воспроизводимости химического анализа четыре образца (один отрицательный и три положительных) были протестированы в повторах в ходе двух исследований в день в течение 20 дней. Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца) определяли для каждого образца. Ниже приведено среднее значение коэффициента отношения, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) для каждого образца:

Межаналитическая сходимость (воспроизводимость)

N=80	Отрицательные образцы	Слабо положительные образцы	Положительные образцы	Резко положительные образцы
Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца)				
среднее	0.04	2.05	3.28	4.64
SD	0.01	0.06	0.10	0.14
% CV	21.0%	2.8%	3.1%	3.0%

10. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Диагноз токсоплазмоза может быть поставлен только по совокупности клинических и серологических данных. Результат единственного анализа с титром антител IgM к токсоплазме не является достаточным для подтверждения недавней инфекции.

Диагноз текущей инфекции ставится только при наличии полной информации о пациенте, включая клинические и лабораторные данные (значимый рост антител IgG к *T. gondii* в двух образцах сыворотки пациента, взятых с 3-х недельным интервалом и протестированных одновременно, антитела IgM к *T. gondii* в диагностически значимом количестве, низкая avidность IgG).

Наличие антител IgM к *T. gondii* не является достаточным для подтверждения текущего заболевания, поскольку IgM могут циркулировать несколько месяцев или даже лет после болезни. Если выявлены IgM, следует провести количественный анализ антител IgG к *T. gondii*, а также отсроченный анализ динамики антител к *T. gondii* как минимум еще в одном образце сыворотки через 3 недели.

Если образец был взят в слишком ранние сроки первичной инфекции, антитела IgM к *T. gondii* могут еще не появиться. При сохраняющихся подозрениях, необходимо сделать повторный анализ через 3 недели, и еще раз определить наличие IgM.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все промышленные реактивы производятся в соответствии с нашей Системой контроля качества от момента заготовки сырья до выпуска готовой формы. Каждое наименование проходит контроль качества и поступает в продажу только при соответствии установленным критериям приемки. Компания «Био-Рад» располагает документацией о производстве и контроле качества каждого конкретного наименования

12. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. инструкцию на английском языке.

ПЛАТЕЛИЯ ТОХО IgG АВИДНОСТЬ 48 ТЕСТОВ 72842

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИ-*TOXOPLASMA GONDII* IgG АВИДНОСТИ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ МЕТОДОМ ИФА



1. НАЗНАЧЕНИЕ

Плателия Тохо IgG авидность – иммуноферментный анализ для определения авидности анти- *T.gondii* IgG антител в сыворотке человека. Плателия Тохо IgG авидность исследование должно проводиться совместно с набором Плателия Тохо IgG (каталожный номер 72840).

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

T.gondii – простейшее вызывающее инфекции у многих видов млекопитающих и птиц. Токсоплазмам, часто встречающиеся у человека и животных, наиболее характерна бессимптомность. Широкая распространенность этой инфекции в популяции, установленная с помощью серологических тестов, может отличаться в зависимости от страны происхождения и возраста. Токсоплазмоз в течении беременности влечет за собой серьезные врожденные аномалии (в том числе, замедление мозговых функций) и иногда мертворождение. Появление Тохо IgG антител у женщины до зачатия обеспечивает гарантию эмбриональной защиты от возможного токсоплазмоза в течении беременности. Предрасположенность в тяжелой токсоплазмозной инфекции распространена у людей со СПИД, или с другими ослаблениями иммунитета. Эти инфекции из-за реактивации цист *T.gondii* присутствующих до ВИЧ-инфекции. Специфический диагноз *T.gondii* инфекции может осложняться и выделение паразита является редким. Серологическое подтверждение *T.gondii* антител показывает на контакт с паразитом и стало широко применимо как метод определения иммунного статуса и восприимчивости к инфекции. Скрининг нескольких изоформ позволяет либо датирование *T.gondii* либо выполнение соответствующей терапии в случае свежей инфекции или предположение профилактических рекомендаций: руководства по гигиене и диете для беременных женщин, химиопрофилактика в популяции с ослабленным иммунитетом. Тем не менее, различить диагнозы между свежей и прошедшей инфекцией иногда сложно благодаря продолжительности анти- *T.gondii* IgM антител или повторному появлению анти- *T.gondii* IgM антител в случае повторной инфекции, реактивирование латентной инфекции или неспецифическое стимулирование иммунной системы. В таких ситуациях, измерение авидности методом ИФА может помочь дифференцировать между острой и прошедшей инфекцией. Эта детерминация основана на развитии последней стадии иммунного ответа, которая переходит в синтез низко авидных IgG антител в течение прединфекции и высоко авидных IgG антител после инфекции.

3. ПРИНЦИП

Этот тест проводится с помощью Плателия Тохо IgG авидность (каталожный номер 72842) совместно с Плателия Тохо IgG (каталожный номер 72840).

Принцип этого метода основан на измерении авидности IgG антител к *T.gondii*. Использование вещества (как мочевины) диссоциирующего связи антиген/антитело в параллели с обычной техникой измерения антител IgG позволяет сравнить оптическую плотность (ОП) полученные после действия диссоциирующего агента и ОП полученную без действия диссоциирующего агента. Авидность считается низкой когда связь антиген/антитело легко разрушается. Авидность считается высокой когда связь антиген/антитело не легко разрушается. Этот тестиспользуется только для положительных образцов которые показывают анти- *T.gondii* IgG концентрацию выше или эквивалентную 9МЕ/мл с Плателией ТОХО IgG (каталожный номер 72840).

Шаг 1.

Контроли авидности и сыворотки пациентов с концентрацией анти- *T.gondii* IgG от 9 до 80 МЕ/мл разводятся 1/101. Сыворотки от пациентов с концентрацией анти- *T.gondii* IgG равной или выше чем 80

МЕ/мл разводятся 1/808. Разведенные образцы вносятся в двух повторностях в лунки микроплата покрытые антигеном *T.gondii*. В течении инкубации 1 час при 37°C, IgG антитела к *T.gondii* присутствующие в образце связываются с *T.gondii* антигеном нанесенным на лунки микроплата. После инкубации, несвязанные неспецифические антитела и другие сывороточные белки удаляются отмывкой.

Шаг 2.

Каждый контроль авидности и каждая сыворотка пациента обрабатывается дважды: контрольный раствор добавляется в одну лунку в диссоциирующий раствор в другую лунку. В течении этой инкубации 15 минут при комнатной температуре (+18-30°C), диссоциирующий раствор пытается диссоциировать антиген/антигенные комплексы. После инкубации, как растворы, так и диссоциированные IgG удаляются отмывкой.

Шаг 3.

Конъюгат (пероксидазопомеченные поликлональные антитела специфичные к человеческим гамма цепям) вносится в лунки микроплата. В течении этой инкубации один час при 37°C, помеченные антитела связываются с сывороточными IgG захваченными *T.gondii* антигеном. Несвязанный конъюгат удаляется отмывкой в конце инкубирования.

Шаг 4.

Присутствие иммунного комплекса (*T.gondii* антиген, IgG антитела к *T.gondii*, анти- IgG конъюгат) показывается внесением в каждую лунку ферментного окрашивающего раствора.

Шаг 5.

После инкубирования 30 минут при комнатной температуре (+18-30°C), ферментативная реакция останавливается добавлением 1 N раствора серной кислоты. Считываемая оптическая плотность полученная спектрофотометром при 450/620 нм пропорциональна количеству IgG антител к *T.gondii* присутствующим в лунке.

4. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

Приложенные количества реагентов рассчитаны, чтобы провести 48 тестов с набором Плателии ТОХО IgG (каталожный номер 72840). Все реагенты исключительно для in vitro диагностического использования.

Этикетка		Природа реагентов	Форма выпуска
R5a	Low Avidity Control	Low Avidity Control: Человеческая сыворотка реактивная к IgG антителам к <i>T.gondii</i> , и отрицательная к антигену гепатита В, анти ВИЧ 1, анти-ВИЧ 2 и анти-гепатит С Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1×0,75 мл
R5b	High Avidity Control	High Avidity Control: Человеческая сыворотка реактивная к IgG антителам к <i>T.gondii</i> , и отрицательная к антигену гепатита В, анти ВИЧ 1, анти-ВИЧ 2 и анти-гепатит С Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1×0,75 мл
R12	Control Solution	Control Solution: Трис-NaCl буфер (pH7,6±0,2), 0,1% Твин 20 и зеленый краситель. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1×28 мл
R13	Dissociating Solution	Dissociating Solution: Трис-NaCl буфер (pH7,6±0,2), мочевина. 0,1% Твин 20 с желтым красителем. Консервант: < 0,001 % ProClin™ 300	1×13 мл

Условия хранения и дату срока годности смотрите на коробке.

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Надежность результатов зависит от правильного выполнения следующей надлежащей лабораторной практики:

- Не использовать просроченные реагенты
- Не смешивать и не объединять при проведении одного анализа реактивы из разных партий.
- Перед использованием, подождать 1 час 30 мин чтобы дать реагентам достичь комнатной температуры (+18-30°C).
- Использовать стеклянную посуду тщательно вымытую и сполоснутую деионизованной водой или, предпочтительно одноразовые материалы.
- Использовать новые пипетки для каждого образца.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование для аккуратного и корректного выполнения действий.
- Строго следуйте процедуре анализа.
- Смотрите также инструкцию на набор Плателии Тохо IgG (каталожный номер 72840).

Примечание: Плателия Toxo IgG avidность набор может использоваться с различными партиями Плателии TOXO IgG (каталожный номер 72840).

ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ НА РАБОЧИХ МЕСТАХ

Использованные материалы человеческого происхождения были протестированы и признаны не реактивными к поверхностным антигенам (Hbs, Ag), антителам к вирусу гепатита С (анти-гепатит С), и к ВИЧ (анти-Вич1 и анти-Вич2). Так как нет метода который может абсолютно гарантировать отсутствие инфекционных агентов, обращайтесь в реагентами человеческого происхождения и образцами пациентов как с потенциально способными переносить инфекционные заболевания:

- Любые материалы, включая промывочный раствор, который напрямую контактирует с образцами и реагентами, содержащими материал человеческого происхождения должны считаться способными переносить инфекционные заболевания.
- Одевайте перчатки при работе с образцами и реагентами.
- Не пипетируйте ртом. Исключите разлив образцов или растворов содержащих образцы. Пролитые растворы должны заливаться 10 % раствором хлорамина. В случае разлива с кислотой, сначала нейтрализовать бикарбонатом натрия, и затем залить 10% раствором хлорамина и высушить фильтровальной бумагой. Материалы, использованные для очистки должны выкидываться в контейнер для контаминированных отходов.
- Образцы пациентов, реактивы, содержащие материалы человеческого происхождения, так же как и контаминированные материалы и продукты должны выбрасываться только после деконтаминации с биологическими и химическими отходами необходимо работать в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.
- Все реактивы набора исключительно только для использования в in vitro диагностике
- Смотрите также инструкцию для Плателии TOXO IgG (каталожный номер 72840).



Предупреждение: Некоторые реагенты содержат ProClin 300 < 1,5 %

R43: Могут быть случаи чувствительности при контакте с кожей.

S28-37: После контакта с кожей, промойте немедленно с избыточным количеством воды и мыла. Одевайте соответствующие перчатки.

6. ОБРАЗЦЫ

1. Только сыворотки рекомендованный тип образца.

2. Обращайте внимание на следующие рекомендации для работы и хранения образцов крови:

- Отбирайте все образцы крови обращая внимание на общепринятые меры безопасности при венопункции.
- Позвольте образцам полностью свернуться до центрифугирования.
- Все время храните пробирки закрытыми
- После центрифугирования, отделите сыворотку от сгустка или эритроцитов в хорошо закрытых пробирках для хранения.
- Образцы могут храниться при +2-8°C если тест выполняется в течении 7 дней.
- Если тест не завершается в течении 7 дней или для транспортировки, заморозьте образцы при -20°C или холоднее.
- Не используйте образцы, которые были разморожены более чем 5 раз.
- Замороженные образцы должны быть тщательно перемешаны (Вортекс) после оттаивания перед тестированием

3. Образцы содержащие 90 г/л альбумина или 100 мг/л неконъюгированного билирубина, липемические образцы содержащие эквивалент 36 г/л триолеина (триглицерид), и гемолизированные образцы содержащие до 10 г/л гемоглобина не оказывают влияния на результат.

4. Не нагревайте образцы.

7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1. Материалы необходимые, но не входящие в состав.

Смотрите инструкцию на Плателию TOXO IgG (каталожный номер 72840).

7.2. Разведение реагентов

- **R5a, R5b:** Low Avidity Control (R5a) b High Avidity Control (R5b) должны разводиться 1/101 с помощью разбавителя R7 поставляемым с Плателией TOXO IgG (каталожный номер 72840).
- **R12, R13:** Control Solution (R12) и Dissociating Solution (R13) – готовы для использования.
- Для других реактивов, пожалуйста, смотрите инструкцию на Плателию TOXO IgG (каталожный номер 72840).

7.3. Хранение и годность открытых и/или разведенных реактивов.

Наборы должны храниться при 2-8°C. Когда набор хранится при 2-8°C до открытия, каждый компонент может использоваться до даты срока годности показанной на внешней этикетке набора.

- **R5a, R5b:** открытые и неконтаминированные реактивы хранятся при 2-8°C и стабильны до 16 недель.

- **R12, R13:** открытые и неконтаминированные реактивы хранятся при 2-80С и стабильны до 16 недель.

Смотрите также инструкцию на Плателию TOXO IgG (каталожный номер 72840).

7.4. Процедура

Строго следуйте процедуре анализа и надлежащей лабораторной практике.

Используйте Low Avidity (R5a) и High Avidity (R5b) контроли с каждой постановкой анализа для подтверждения результатов анализа.

Другие реактивы для использования (R1, R2, R6, R7, R9, R10) включены в набор Плателия TOXO IgG (каталожный номер 72840).

Примечание: перед использованием, подождите 1 ч 30 мин чтобы позволить реактивам достичь комнатной температуры (+18-30°C), особенно для реактивов R12 и R13.

1. Осторожно установите план внесения и идентификации для контролей и образцов пациентов.
2. Подготовьте разбавленный Washing Solution (R2).
3. Возьмите стрип из защитного закрывающегося пакета.
4. В индивидуальных проидентифицированных пробирках, разведите 1/101 в Diluent (R7) Avidity controls (R5a, R5b) и образцы пациентов (S1, S2...) имеющие анти- *T.gondii* IgG концентрацию между 9 и 80 ME/мл (10 мкл образца и 1 мл Diluent (R7)). Сыворотки пациентов с концентрацией анти- *T.gondii* IgG равной или более 80 ME/мл разодить 1/808 (10 мкл образца и 1 мл Diluent (R7)), затем 100 мкл первого разведения и 700 мкл Diluent (R7). Перемешайте разведенные образцы.
5. Строго следуя показанной ниже последовательности, внесите в каждую лунку 200 мкл разведенных контролей и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R5a	R5a	S7	S7								
B	R5b	R5b										
C	S1	S1										
D	S2	S2										
E	S3	S3										
F	S4	S4										
G	S5	S5										
H	S6	S6										

6. Закройте микроплато адгезивной пленкой, плотно прижмите к плату чтобы обеспечить герметичное закрытие. Незамедлительно инкубируйте микроплато на водяной бане или в суховоздушном инкубаторе 1 час ± минут при 37°C±1°C.
7. В конце первого периода удалите инкубационную пленку. Аспирируйте содержимое всех лунок в контейнер с биологическими отходами (содержащий гипохлорид натрия).
8. Быстро внесите 200 мкл Control Solution (R12) в каждую лунку нечетного стрипа. Затем быстро внесите 200 мкл Dissociating Solution (R13) в каждую лунку данного стрипа.
9. Инкубируйте микроплато 15 мин ± 2 мин при комнатной температуре (+18-30°C).
10. До конца инкубационного периода подготовьте рабочий раствор конъюгата (R6+R7).
11. В конце инкубационного периода аспирируйте содержимое всех лунок в контейнер для биологических отходов (содержащий гипохлорид натрия). Промойте микроплато 2 раза с 350 мкл Washing Solution (R2). Переверните микроплато и осторожно стукните то фильтровальной бумаге чтобы удалить оставшуюся жидкость.
12. Внесите незамедлительно 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) во все лунки. Раствор должен быть осторожно перемешан перед использованием..
13. Закройте микроплато адгезивной пленкой, плотно прижмите к плату чтобы обеспечить герметичное закрытие. Незамедлительно инкубируйте микроплато на водяной бане или в суховоздушном инкубаторе 1 час ± минут при 37°C±1°C.
14. В конце периода удалите инкубационную пленку. Аспирируйте содержимое всех лунок в контейнер с биологическими отходами (содержащий гипохлорид натрия). Промойте микроплато 4 раза с 350 мкл Washing Solution (R2). Переверните микроплато и осторожно стукните то фильтровальной бумаге чтобы удалить оставшуюся жидкость.
15. Быстро внесите в каждую лунку и уберите со света 200 мкл Chromogen solution (R9). Дайте реакции развиваться в темноте 30±5 мин при комнатной температуре (+18-30°C). В течении инкубации н используйте адгезивную лунку.
16. Остановите ферментативную реакцию внесением 100 мкл Stopping Solution (R10) в каждую лунку. Используйте ту же последовательность и темп внесения как при окрашивающем растворе.

17. Осторожно протрите дно платы. Считывайте оптическую плотность при 450/620 нм используя микропланшетный ридер в течении 30 минут после останавливающей реакции. Стрипы всегда должны убираться со света до считывания.
18. До сообщения результатов проверьте соответствие между считыванием и планом внесения плата и образцов.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Расчет индекса avidности

Индекс avidности (ИА) образца – отношение оптической плотности (ОП) измеренной с Dissociating Solution (R13) и Control Solution (R12):

$$ИА = \frac{ОП_{образца} R13}{ОП_{образца} R12}$$

Расчет ИА образца может проводиться только если ОП полученная с Control Solution выше чем 0,150.

8.2. Контроль качества

Включайте все контроли для каждого микроплата и каждого анализа и анализируйте полученные результаты. Для подтверждения анализа следующие критерии должны совпадать:

- Значения оптической плотности с Control Solution (R12):
ОП R5a $\geq 0,200$
ОП R5b $\geq 0,200$
- Индекс avidности:
ИА R5a $< 0,40$
ИА R5b $\geq 0,50$

Если эти критерии контроля качества не совпадают, анализ должен быть повторен

8.3. Интерпретация результатов

Индекс avidности (ИА)	Интерпретация
ИА $< 0,40$	Зона низкой avidности
$0,40 \leq \text{ИА} < 0,50$	Зона средней avidности
ИА $\geq 0,50$	Зона высокой avidности

Индексы avidности менее чем 0,40 - более в пользу недавней первичной инфекции менее чем 20 недель.

Тем не менее, такие результаты не позволяют подтвердить этот диагноз с абсолютной уверенностью.

Индекс avidности больше или равный 0,50 более в пользу прошедшей инфекции более чем 20 недель. Тем не менее такие результаты не позволяют исключить недавнюю первичную инфекцию менее чем 20 недель с абсолютной уверенностью.

Если недавняя инфекция заподозрена или если индекс avidности в серой зоне, может быть протестирован второй образец (см. действующий закон относительно мониторинга пациентов).

8.4. Инструкция по поиску и устранению неисправностей

Не подтвержденные и невоспроизводимые реакции часто могут вызываться:

- Не соответствующей требованиям температурой реагентов
- Не соответствующей требованиям промывке микроплата
- Не правильным разведением образцов
- Контаминированием отрицательных образцов сывороткой с высоким титром антител
- Контаминированием ферментативного раствора химическими окислительными агентами (гипохлориды, ионы металлов...).
- Контаминирование стоп раствора

10. Ограничения процедура

Диагноз инфекции *T.gondii* может устанавливаться только на основании комбинации клинических и биологических данных. Результат одного теста титрования анти- *T.gondii* IgG антител и измерения их avidности не дает достаточных оснований для диагноза недавней инфекции *T.gondii*.

Вирус краснухи IgG

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА PLATELIA™ RUBELLA IgG 72850

96 тестов

Количественное определение антител IgG к вирусу краснухи в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

1. ПРИМЕНЕНИЕ

Platelia™ Rubella IgG представляет собой диагностическую систему для количественного определения антител IgG к вирусу краснухи в сыворотке и плазме крови человека методом непрямого иммуноферментного твердофазного анализа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Краснуха (обычно ее называют коревой краснухой) является вирусным заболеванием и распространена во всем мире. В большинстве случаев у детей и взрослых краснуха протекает легко. Клинические проявления включают субфебрильную температуру, головную боль, боль в горле и генерализованные высыпания на коже.

Однако во время беременности краснуха имеет более тяжелое течение. Доказано, что вирус дает осложнения в виде множественных врожденных пороков, включая глухоту, катаракту, задержку умственного развития и гибель плода.

Активная иммунизация детей дошкольного возраста значительно снизила распространенность эпидемии краснухи, тем не менее, необходимость тщательного мониторинга иммунного статуса, особенно у женщин репродуктивного возраста, остается. Наличие антител IgG к вирусу краснухи у женщин до беременности гарантирует защиту плода от возможного заражения данной инфекцией во внутриутробном периоде. Эффективность вакцинации также подтверждается выявлением антител IgG к вирусу в сыворотке крови после вакцинации.

Вирус краснухи был выделен в 1962 году, и с этого момента определение специфических антител представляло крайне важную задачу в связи с тератогенным воздействием вируса. Разрабатывались методы диагностики, такие как реакция нейтрализации, реакция связывания комплемента и иммунофлюоресценция.

Все они оказались либо трудоемкими для рутинной лабораторной практики, либо давали нестойкие или непостоянные результаты. Быстро диагностировать острую инфекцию и определять иммунный статус пациента позволили методики на основе реакции торможения гемагглютинации. Впервые метод иммуноферментного анализа был описан учеными Engvall и Perlmann в 1971 году.

Развитие технологий иммуноферментного анализа повысило специфичность и чувствительность метода для определения большого количества антигенов и антител.

Результаты последовательно проведенных серологических тестов, показывающих наличие IgM, появление или значимое нарастания титра антител IgG (удвоение титра) в двух образцах сыворотки, взятых с минимальным интервалом в три недели, следует расценивать как доказательство манифестации вируса краснухи, даже если клинические патогномичные признаки инфекции отсутствуют.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Platelia™ Rubella IgG - это диагностическая система для определения и титрования антител IgG к вирусу краснухи в сыворотке и плазме крови человека при помощи метода непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Антигены краснухи сорбированы на микропланшете. Моноклональные антитела, меченные пероксидазой,

специфичной для гамма-связей человека (анти-IgG), используются в качестве конъюгата. Диагностика проводится в следующем порядке.

• **Этап 1**

Образцы пациентов и калибраторы разводят 1/21 и затем наносят в лунки микропланшета. Во время инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C антитела IgG к вирусу краснухи, имеющиеся в образце, связываются с антигенами краснухи, фиксированными на лунках микропланшета. По окончании инкубации несвязанные неспецифические антитела вместе с другими сывороточными белками удаляют промывками.

• **Этап 2**

Конъюгат (меченные пероксидазой моноклональные антитела, специфичные для гамма-связей человека) наносят в лунки микропланшета. При инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C меченные антитела связываются с сывороточными IgG, захваченными антигенами краснухи. Несвязанный конъюгат удаляют промывками по окончании инкубации.

• **Этап 3**

Наличие иммунных комплексов (антиген краснухи/антитела IgG к вирусу краснухи/анти-IgG-конъюгат) подтверждают добавлением ферментативного рабочего раствора в каждую лунку.

• **Этап 4**

После инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) ферментативную реакцию прерывают при помощи добавления 1N раствора серной кислоты. Оптическая плотность, полученная на спектрофотометре в диапазоне 450/620 нм, пропорциональна содержанию антител IgG к антигенам краснухи в образце сыворотки и затем переводится в МЕ/мл по стандартной калибровочной кривой (Международный стандарт ВОЗ RUBI 1-94).

4. ОПИСАНИЕ НАБОРА

Набор реактивов рассчитан на проведение 96 тестов. Все реактивы предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

	Наименование	Химический состав реактива	Форма выпуска
R1	Микропланшет	Микропланшет: (готовый к использованию): 12 стрипов с 8 отламываемыми лунками, покрытыми антителами к μ -связям человека.	1
R2	Концентрированный промывочный раствор (20x концентрат)	Концентрированный промывочный раствор (20x концентрат): Трис-NaCl-буферный раствор (pH 7.4), 2% Твин® 20 Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 70 мл
R3	Калибратор 0	Калибратор 0: Отрицательная сыворотка по антителам IgG к вирусу краснухи Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R4a	Калибратор 15	Калибратор 15 МЕ/мл: Человеческая сыворотка положительная по антителам IgG к вирусу краснухи, отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R4b	Калибратор 60	Калибратор 60 МЕ/мл:	1 x 0.75 мл

		Человеческая сыворотка положительная по антителам IgG к вирусу краснухи, отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	
R4c	Калибратор 200	Калибратор 200: Человеческая сыворотка положительная по антителам IgG к вирусу краснухи, отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R6	Конъюгат (51x концентрат)	Конъюгат (51x концентрат): Мышинные моноклональные антитела к гамма-связям человека, сцепленные с пероксидазой хрена. Консервант : < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.7 мл
R7	Растворитель	Растворитель для образцов и конъюгата (готовый к использованию): трис-NaCl-буферный раствор (pH 7.7), глицерол, 0.1% Твин® 20, фенол красный Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 80 мл
R9	Хромоген ТМБ	Хромоген (готовый к использованию): 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (< 0.1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 мл
R10	Стоп-реагент	Стоп-реагент (готовый к использованию): раствор серной кислоты 1N	1 x 28 мл
		Материал для запечатывания микропланшетов	4

Условия хранения и срок годности см. на упаковке.

5. ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от строгого соблюдения следующих стандартов «Надлежащей лабораторной практики»:

- Не используйте просроченные реактивы.
- Не смешивайте и не используйте во время одного исследования реактивы из разных партий.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Для промывочного раствора (маркировка R2: 20x концентрат, зеленого цвета), хромогена (маркировка R9: ТМБ бирюзового цвета) и стоп-реагента (маркировка R10: 1N красного цвета) допустимо использовать не только те партии реактивов, которые входят в набор, при условии, что используемые реактивы будут строго эквивалентны и в ходе одного исследования будут взяты из одного и того же комплекта.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Не допускается использовать растворитель (R7) из других комплектов, используйте реактив только из данного набора. Также недопустимо

использовать растворитель (R7) из диагностической системы *Platelia™ Rubella IgM* (№ 72851).

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Промывочный раствор (маркировка R2: 20х концентрат, зеленого цвета) допустимо смешивать с двумя другими промывочными растворами из различных наборов реактивов компании «Био-Рад» (маркировка R2: 10х концентрат голубого цвета или 10х концентрат оранжевого цвета). При этом растворы должны быть надлежащим образом восстановлены, и в ходе одного исследования их можно смешивать только один раз.

- Перед использованием подождите 30 минут для того, чтобы реактивы нагрелись до комнатной температуры (+18-30°C).
- Аккуратно восстанавливайте и разводите реактивы, избегая попадания каких-либо примесей.
- Не проводите исследование в присутствии химически активных паров (пары кислот, щелочей, альдегидов) и пыли, которые могут изменить активность ферментов в составе конъюгата.
- Используйте стеклянные емкости, тщательно вымытые и промытые деионизированной водой, однако предпочтительнее использовать одноразовый материал.
- Промывка микропланшета является важнейшим этапом исследования: соблюдайте рекомендуемое количество промывок и проверяйте, чтобы все лунки вначале были полностью заполнены, а затем полностью опорожнены. Ненадлежащая промывка может привести к ложным результатам.
- Следите за тем, чтобы поверхность микропланшета не высыхала в промежутке между промывкой и внесением реактивов.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для внесения конъюгата и ферментативного раствора.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к примесям металлов и их ионам. Поэтому не допускайте контакта металлических предметов с любыми растворами, содержащими конъюгат или хромоген.
- Раствор хромогена (R9) должен быть бесцветным. Появление синего оттенка говорит о том, что реактив использовать нельзя и следует заменить.
- Используйте новый наконечник дозатора для каждого образца сыворотки.
- Проверяйте исправность дозаторов и другого инструментария.

ИНСТРУКЦИИ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Компоненты человеческого материала, используемые в составе реактивов, были проверены и являются отрицательными к наличию поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антител к гепатиту С (HCV) и к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ1 и ВИЧ2). Однако, поскольку ни один метод не может абсолютно гарантировать отсутствие инфекционных возбудителей, работайте с реактивами человеческого происхождения и с образцами сыворотки пациентов как с возможными источниками инфекционных заболеваний:

- Любой материал, в том числе и промывочные растворы, непосредственно контактирующий с образцами сыворотки и реактивами, содержащими человеческий материал, должен рассматриваться как возможный источник инфекционного заболевания.
- Работайте с реактивами и образцами в одноразовых перчатках.
- Не набирайте реактивы в дозатор ртом.

- Старайтесь не разливать образцы и растворы с сывороткой. Пролитую жидкость необходимо смыть осветлителем, разведенным до 10 %. Если пролилась кислота, ее следует вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем очистить 10% раствором осветлителя и просушить поверхность фильтровальной бумагой. Материал, использованный для очистки, утилизируется в контейнер для загрязненных отходов.
- Образцы сыворотки пациентов, реактивы, содержащие человеческий материал, а также загрязненный материал и вещества должны быть утилизированы только после обеззараживания:
 - либо погружением в осветлитель с итоговой 5 % концентрацией гипохлорита натрия на 30 минут.
 - либо при помощи автоклавирования при температуре 121°C в течение минимум 2 часов.

ОСТОРОЖНО: не ставьте в автоклав растворы, содержащие гипохлорит натрия.

- Избегайте попадания реактивов, в том числе и тех, которые считаются безопасными, на кожу и слизистые оболочки.
- Работать с химическими и биологическими отходами, а также проводить их утилизацию необходимо в соответствии со стандартами «Надлежащей лабораторной практики».
- Все реактивы в наборе предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

Осторожно:



Xi - Irritant

Некоторые реактивы содержат консервант ProClin™ 300 < 1.5%

R43: При контакте с кожей может вызвать раздражение.

S28-37: При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды с мылом. Работайте в специальных перчатках.

6. ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка и плазма крови (этилендиаминтетрауксусная кислота, гепарин, цитрат) являются рекомендуемыми типами образцов.

2. При работе с образцами крови, их исследовании и хранении соблюдайте следующие рекомендации:

- Забор образцов крови осуществляйте с соблюдением стандартных мер предосторожности при венепункции.
- Дождитесь завершения тромбообразования в сыворотке перед центрифугированием.
- Всегда держите пробирки закрытыми.
- После центрифугирования отделите сыворотку или плазму от тромба или эритроцитов в плотно закрывающуюся пробирку для хранения.
- При проведении анализа не позднее, чем в течение 7 дней, образцы можно хранить при температуре +2-8°C.
- Если в течение 7 дней анализ проведен не был, а также для транспортировки, образцы замораживают при температуре -20°C и ниже.
- Не используйте образцы, размороженные более 5 раз. После того, как замороженные образцы оттаяли, перед постановкой исследования их необходимо тщательно перемешать (при помощи вортекса).

3. Образцы с содержанием альбумина до 90 г/л или неконъюгированного билирубина до 100 мг/л, образцы с содержанием липидов, эквивалентных 36 г/л триолеина

(триглицерида), а также гемолизированная сыворотка с гемоглобином до 10 г/л не влияют на результат.

4. Не нагревайте образцы.

7. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

7.1 Дополнительные материалы, не входящие в комплект

- Центрифуга/вортекс.
- Автоматический считыватель для микропланшета с фильтрами 450 нм и 620 нм (*).
- Инкубатор для микропланшета с термостатом, настроенным на $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (*).
- Автоматический, полуавтоматический или ручной, промывочный аппарат для микропланшета (*).
- Стерильная дистиллированная или деионизированная вода.
- Одноразовые перчатки.
- Лабораторные или защитные очки.
- Фильтровальная бумага.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или с заданными параметрами дозаторы или мультидозаторы для дозирования и разведения объемов от 10 мкл до 1000 мкл, а также 1 мл, 2 мл и 10 мл.
- Мензурки емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1000 мл.
- Контейнер для биологически опасных отходов.
- Одноразовые пробирки.

(*) Для получения дополнительной информации по рекомендованному оборудованию Вы можете связаться с нашей технической службой.

7.2 Восстановление реактивов

- **R1:** Перед тем, как открыть контейнер, оставьте его на 30 минут при комнатной температуре ($+18-30^\circ\text{C}$). Выньте рамку-держатель, сразу же положите обратно в контейнер неиспользуемые стрипы и проверьте, чтобы там был влагопоглотитель. Тщательно запечатайте контейнер и поместите его на хранение при температуре $+2-8^\circ\text{C}$.
- **R2:** Разведите промывочный раствор R2 в дистиллированной воде 1/20 (например, 50 мл R2 и 950 мл дистиллированной воды), чтобы получить готовый к использованию промывочный раствор. Подготовьте 350 мл разведенного промывочного раствора на один 12-стриповый микропланшет для ручной промывки.
- **R3, R4a, R4b, R4c:** разведите 1/21 Растворителем (R7) (пример: 300 мкл R7 + 15 мкл Калибратора).
- **R6+R7:** Конъюгат (R6) находится в виде 51x концентрата, и его необходимо гомогенизировать перед использованием. Разведите 1/51 в Растворителе (R7). На один планшет разведите 0.5 мл Конъюгата (R6) в 25 мл Растворителя (R7). Разделите полученные объемы на 10, чтобы задать объем для одного стрипа.

7.3 Хранение и срок годности открытых и/или восстановленных реактивов

Набор реактивов следует хранить при температуре $+2-8^\circ\text{C}$. При хранении набора при температуре $+2-8^\circ\text{C}$ все реактивы можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке на упаковке набора.

- **R1:** После вскрытия упаковки стрипы остаются стабильными в течение 8 недель при хранении при температуре $+2-8^\circ\text{C}$ в той же плотно закрытой упаковке (проверьте наличие влагопоглотителя).
- **R2:** После разведения Промывочный раствор можно хранить 2 недели при температуре $+2-30^\circ\text{C}$. После вскрытия концентрированный Промывочный раствор,

хранящийся при +2-30°C и без примесей остается устойчивым до истечения срока годности, указанного на этикетке.

- **R3, R4a, R4b, R4c, R6, R7:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при температуре +2-8°C реактивы остаются стабильными до 8 недель.
- **R6+R7:** После разведения рабочий раствор конъюгата остается стабильным до 8 часов при комнатной температуре (+18-30°C) или в течение 2 недель при температуре +2-8°C.
- **R9:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при +2-8°C реактив остается стабильным до 8 недель.
- **R10:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при +2-8°C реактив остается стабильным до истечения срока годности, указанного на этикетке.

7.4 Порядок работы

Строго соблюдайте порядок химического анализа и стандарты «Надлежащей лабораторной практики».

Перед использованием реактивы должны нагреться до комнатной температуры (+18-30°C).

При отламывании и работе с лунками следует соблюдать особую аккуратность. Используйте все калибраторы при каждой постановке анализа для подтверждения результатов.

1. Внимательно составьте план распределения и маркировки калибраторов и образцов сыворотки пациентов.
2. Подготовьте разведение Промывочного раствора (R2) [см. Раздел 7.2].
3. Выньте рамку-держатель и стрипы (R1) из защитной упаковки [см. Раздел 7.2].
4. В индивидуально промаркированных пробирках разведите Калибраторы (R3, R4a, R4b, R4c) и образцы пациентов (S1, S2...) с Растворителем (R7) до концентрации 1/21: 300 мкл Растворителя (R7) и 15 мкл образца [см. Раздел 7.2]. Перемешайте разведенные образцы при помощи вортекса.
5. Строго соблюдайте указанную ниже последовательность, вносите в каждую ячейку по 200 мкл разведенных калибраторов и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5	S13									
B	R4a	S6										
C	R4b	S7										
D	R4c	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

6. Накройте микропланшет адгезионным материалом, плотно прижмите, чтобы обеспечить герметичность. Сразу же поставьте микропланшет в водный термостат или в суховоздушный инкубатор на 1 час ± 5 минут при 37°C ± 1°C.

7. Перед окончанием первой инкубации подготовьте рабочий раствор конъюгата (R6+R7) [см. раздел 7.2].

8. По окончании первой инкубации снимите адгезионный материал и аспирируйте содержимое из всех лунок в контейнер для биологически активных отходов (содержащий натрия гипохлорит). Промойте микропланшет 4 раза 350 мкл Промывочного раствора (R2). Переверните планшет и, аккуратно постукивая по фильтровальной бумаге, стряхните остатки реагентов.

9. Сразу же добавьте 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) во все лунки. Перед использованием растворов следует аккуратно взболтать.
10. Накройте микропланшет адгезионной пленкой, плотно прижмите, чтобы обеспечить герметичность. Сразу же поставьте микропланшет в водный термостат или в суховоздушный инкубатор на $1 \text{ час} \pm 5 \text{ минут}$ при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
11. По окончании второй инкубации снимите адгезионный материал и аспирируйте содержимое из всех лунок в контейнер для биологически активных отходов (содержащий натрия гипохлорит). Промойте микропланшет 4 раза 350 мкл Промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и, аккуратно постукивая по фильтровальной бумаге, стряхните остатки реагентов.
12. Быстро (**не на свету**) распределите в каждую лунку по 200 мкл Раствора хромогена (R9). **Химическая реакция должна проходить в темноте в течение 30 ± 5 минут при комнатной температуре ($+18-30^\circ\text{C}$).** При данной инкубации адгезионный материал не используется.
13. Остановите ферментативную реакцию, добавив 100 мкл стоп-реагента (R10) в каждую лунку. Придерживайтесь той же последовательности и схемы распределения как и для ферментативного раствора.
14. Тщательно протрите рабочую поверхность сканера. При помощи спектрофотометра определите оптическую плотность в диапазоне 450/620 нм в течение 30 минут после остановки реакции. Перед считыванием стрипы необходимо все время держать в темноте.
15. Перед описанием результатов проверьте, соответствуют ли друг другу данные считывания и схемы сканера и распределения образцов.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Построение стандартной калибровочной кривой

Наличие и концентрация антител IgG к вирусу краснухи в образце сыворотки определяется путем сравнения оптической плотности (ОП) образца и концентрации в Международных Единицах на миллилитр (МЕ/мл) калибраторов стандартной калибровочной кривой. Platelia™ Rubella IgG стандартизирована по Международному стандарту ВОЗ RUBI 1-94.

Постройте стандартную калибровочную кривую [ОП = функция (МЕ/мл)], расположив показатели ОП калибраторов R3, R4a, R4b, R4c по вертикальной оси (Y), а их соответствующие концентрации в МЕ/мл - по горизонтальной оси (X). Для каждого образца рассчитайте титр антител IgG к вирусу краснухи, определив по построенной стандартной калибровочной кривой концентрации, соответствующие полученным значениям ОП.

ВАЖНО: Если значение ОП образца, разведенного 1/21 > ОП R4c, этот образец следует развести до 1/210 растворителем R7 и повторить пробу. Значения МЕ/мл затем необходимо умножить на 10.

8.2 Контроль качества

Процедура включает все калибраторы для каждого микропланшета для каждой пробы и анализ полученных результатов. Для верификации исследования должны быть соблюдены следующие критерии:

- Показатели оптической плотности:

ОП R4a ≥ 0.200

ОП R4b ≥ 0.400

- Коэффициенты отношения оптической плотности:

ОП R4a / ОП R3 ≥ 5.00

ОП R4b / ОП R4a ≥ 1.50

ОП R4c / ОП R4b ≥ 1.20

Если результат не соответствует данным критериям контроля качества, исследование следует повторить.

8.3 Интерпретация результатов

Титр антител к вирусу краснухи (Международные единицы/мл)	Результат	Интерпретация
Титр < 10 МЕ/мл	Отрицательный	Отрицательный или сомнительный результат говорит об отсутствии приобретенного иммунитета, что не исключает наличие текущей инфекции. При подозрении на текущую инфекцию пациент должен сдать повторный анализ через две недели.
$10 \text{ МЕ/мл} \leq \text{Титр} < 15 \text{ МЕ/мл}$	Сомнительный	
Титр $\geq 15 \text{ МЕ/мл}$	Положительный	Положительный результат обычно указывает на ранее перенесенное заболевание. Однако наличие текущей инфекции исключить нельзя, особенно при наличии антител IgM к вирусу краснухи.

Более высокие отклонения титров наблюдаются при концентрациях выше 150 МЕ/мл.

8.4 Поиск и устранение ошибок

Недостовверные реакции или реакции с низкой повторяемостью обычно происходят в результате:

- Ненадлежащей промывки микропланшета.
- Попадания в отрицательные образцы примесей сыворотки или плазмы с высоким титром антител.
- Попадания в ферментативный раствор химических окислителей (осветлитель, ионы металлов...).
- Попадания примесей в раствор стоп-реагента.

9. ЭКСПЛУАТАЦИЯ

Эксплуатация диагностической системы Platelia™ Rubella IgG осуществлялась на 2 базах, и всего было обработано 952 образца, взятых у беременных женщин и доноров крови. На первой базе проводилось сравнительное исследование с Platelia™ Rubella IgG TMB (72912). На второй – оценивались эксплуатационные параметры Platelia™ Rubella IgG по сравнению с другой диагностической системой ИФА, имеющейся на рынке.

9.1 Распространенность

Распространенность антител IgG к вирусу краснухи по данным Platelia™ Rubella IgG оценивалась по выборке из 322 образцов, взятых у беременных женщин, находящихся под наблюдением в течение беременности и проживающих на севере Франции. 289 образцов оказались положительными по наличию антител IgG к вирусу краснухи. По данным Platelia™ Rubella IgG, распространенность составила 89.8% (289/322).

9.2 Сравнительное исследование (база 1)

Параметры эксплуатации Platelia™ Rubella IgM оценивались по выборке из 534 образцов, распределенных по группам:

- 414 образцов сыворотки доноров крови
- 120 образцов сыворотки беременных женщин

Результаты сравнивали с полученными по Platelia™ Rubella IgG TMB (72912), взятой в качестве эталона.

		Platelia™ Rubella IgG TMB (72912)			
		Отрицательный	Сомнительный*	Положительный	Всего
Platelia™	Отрицательный	149	0	0	149
	Сомнительный*	4	2	0	6
Rubella IgG (72850)	Положительный	0	2	377	379
	Всего	153	4	377	534

Совокупное соответствие 526/526 100.0% [ДИ 95% = 99.3% - 100.0%]

Относительная специфичность 149/149 100.0% [ДИ 95% = 97.5% - 100.0%]

Относительная чувствительность 377/377 100.0% [ДИ 95% = 99.0% - 100.0%]

*сомнительные результаты при расчетах чувствительности, специфичности и соответствия не учитывались

[ДИ 95%] = 95% доверительный интервал.

Также при помощи двух диагностических наборов было протестировано 50 образцов сыворотки после 7 отсроченных вакцинаций (2 с вакциной MERUVAX II, 5 с вакциной RUDIVAX):

- Выявление антител IgG к вирусу краснухи совпало в 6 случаях из 7.
- Выявление антител IgG к вирусу краснухи с Platelia™ Rubella IgG было отсрочено на 5 дней в одном случае.

9.3 Параметры эксплуатации (база 2)

368 образцов, требующих серологического исследования на вирус краснухи, были проверены по Platelia™ Rubella IgG (72850):

- 44 образца сыворотки детей до 18 лет (27 девочек, 17 мальчиков)
- 323 образца сыворотки взрослых (1 мужчина, 322 женщины). Образцы сыворотки взрослых женщин были взяты либо у беременных, либо у наблюдавшихся постнатально спустя несколько недель после родов.
- 1 образец сыворотки из Французского национального исследования контроля качества.

Результаты сравнивали с полученными по другой диагностической системе ИФА, имеющейся на рынке и взятой в качестве эталона.

		Диагностический набор ИФА			
		Отрицательный	Сомнительный*	Положительный	Всего
Platelia™	Отрицательный	32	2	3	37
	Сомнительный*	7	7	6	20
Rubella IgG (72850)	Положительный	1	11	299	311
	Всего	40	20	308	368

Совокупное соответствие 331/335 98.8% [ДИ 95% = 97.0% - 99.7%]

Относительная специфичность 32/33 97.0% [ДИ 95% = 84.2% - 99.9%]

Относительная чувствительность 299/302 99.0% [ДИ 95% = 97.1% - 99.8%]

**сомнительные результаты при расчетах чувствительности, специфичности и соответствия не учитывались*

[ДИ 95%] = 95% доверительный интервал.

Несовпадающие образцы были протестированы при помощи третьей диагностической системы ИФА. Для всех 4 образцов подтвердился отрицательный результат.

9.4 Перекрестная реактивность

Исследование на выявление антител к вирусу краснухи с помощью Platelia™ Rubella IgG (72850) и Platelia™ Rubella IgG TMB (72912) проводилось по выборке из 177 образцов, включая 147 образцов, положительных по токсоплазмозу, ЦМВ, ЭБВ, вирусу герпеса, вирусу Варицелла-Зостер, эпидемическому паротиту, кори и ВИЧ, а также 30 образцов, положительных по ревматоидному фактору, аутоантителам и гетерофильным антителам.

Из 10 образцов, отрицательных по данным Platelia™ Rubella IgG TMB (72912), 8 образцов оказались отрицательными и 2 - сомнительными по данным Platelia™ Rubella IgG.

9.5 Точность

- Внутрианалитическая сходимость (повторяемость)

Для оценки повторяемости химического анализа один отрицательный и три положительных образца были протестированы 32 раза в ходе одного исследования. Концентрацию (МЕ/мл) определяли для каждого образца. Ниже приведено среднее значение концентраций (МЕ/мл), стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) для каждого образца:

Внутрианалитическая сходимость (повторяемость)

N=32	Отрицательные образцы	Слабо положительные образцы	Положительные образцы	Резко положительные образцы
Концентрация (МЕ/мл)				
среднее	2.8	26.4	56.1	171.4
SD	0.1	1.4	2.8	14.0
% CV	3.8%	5.2%	5.0%	8.2%

- Межаналитическая сходимость (воспроизводимость)

Для оценки воспроизводимости химического анализа четыре образца (один отрицательный и три положительных) были протестированы в повторах в ходе двух исследований в день в течение 20 дней. Концентрация (МЕ/мл) определялась для каждого положительного образца. Ниже приведено среднее значение концентраций (МЕ/мл), стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) для каждого образца:

Межаналитическая сходимость (воспроизводимость)

N=80	Отрицательные образцы	Слабо положительные образцы	Положительные образцы	Резко положительные образцы
Концентрация (МЕ/мл)				
среднее	2.4	24.0	56.4	159.4
SD	0.8	2.7	4.6	19.9
% CV	35.6%	11.2%	8.2%	12.5%

9.6 Калибровка и линейность

Для определения точности калибровки было протестировано несколько разведений Международного стандарта ВОЗ RUBI 1-94. Полученные результаты показали, что химический анализ, проводимый с Platelia™ Rubella IgG, точно откалиброван в

соответствии с Международным стандартом ВОЗ RUBI 1-94 для объемов до 60 МЕ/мл. Превышение 60 МЕ/мл дает завышенные примерно на 20% результаты. При помощи серийных разведений с 5 положительными образцами диапазон исследования был установлен в пределах от 10 до 150 МЕ/мл.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Диагноз краснухи может быть поставлен только по совокупности клинических и лабораторных данных. Результатов только одного анализа с титром антител IgG к вирусу краснухи не достаточно для подтверждения заболевания.

Диагноз текущей инфекции ставится только при наличии полной информации о пациенте, включая клинические и лабораторные данные (значимое нарастание антител IgG к вирусу краснухи по 2 образцам сыворотки, взятым с интервалом в 3 недели и обработанным одновременно; наличие диагностически значимого титра антител IgM к вирусу краснухи; низкая авидность IgG к вирусу краснухи).

Наличия антител IgM к вирусу краснухи не достаточно для подтверждения текущей инфекции, поскольку IgM могут циркулировать в крови в течение нескольких месяцев и даже лет после перенесенного заболевания. При обнаружении IgM необходимо провести количественный анализ антител IgG к вирусу краснухи, а также отсроченный анализ динамики антител как минимум еще в одном образце сыворотки через 3 недели.

Если образец был взят в слишком ранние сроки первичной инфекции, IgM могут еще не появиться. При сохраняющихся подозрениях, необходимо сделать повторный анализ через 3 недели, и еще раз определить титр IgM.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все промышленные реактивы производятся в соответствии с нашей Системой контроля качества от момента заготовки сырья до выпуска готовой формы. Каждое наименование проходит контроль качества и поступает в продажу только при соответствии установленным критериям приемки. Компания «Био-Рад» располагает документацией о производстве и контроле качества каждого конкретного наименования.

12. ЛИТЕРАТУРА

См. инструкцию на английском языке.

Вирус краснухи IgM

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА PLATELIA™ RUBELLA IgM 72851

96 тестов

Качественное определение антител IgM к вирусу краснухи в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

1. ПРИМЕНЕНИЕ

Platelia™ Rubella IgM представляет собой диагностическую систему для качественного определения антител IgM к вирусу краснухи в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного твердофазного анализа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Краснуха (часто ее еще называют коревой краснухой) является вирусным заболеванием и распространена во всем мире. В большинстве случаев у детей и взрослых краснуха протекает легко. Клинические проявления включают субфебрильную температуру, головную боль, боль в горле и генерализованные высыпания на коже.

Однако во время беременности краснуха имеет более тяжелое течение. Доказано, что вирус приводит к осложнениям в виде множественных врожденных пороков, включая глухоту, катаракту, задержку умственного развития и гибель плода.

Активная иммунизация детей дошкольного возраста значительно снизила распространенность эпидемии краснухи. Тем не менее, необходимость тщательного мониторинга иммунного статуса, особенно у женщин репродуктивного возраста, остается. Наличие антител IgG к вирусу краснухи у женщин до беременности гарантирует защиту плода от возможного заражения данной инфекцией во внутриутробном периоде. Эффективность вакцинации также подтверждается выявлением антител IgG к вирусу краснухи в сыворотке крови после прививки.

Вирус краснухи был выделен в 1962 году, и с этого момента определение специфических антител к краснухе представляло крайне важную задачу в связи с тератогенным воздействием вируса. Разрабатывались методы диагностики, такие как реакция нейтрализации, реакция связывания комплемента и иммунофлюоресценция.

Все они оказались либо трудоемкими для рутинной лабораторной практики, либо давали нестойкие или непостоянные результаты. Быстро диагностировать острую инфекцию и определять иммунный статус пациента позволили методики на основе реакции торможения гемагглютинации. Впервые метод иммуноферментного анализа был описан учеными Engvall и Perlmann в 1971 году.

Развитие технологий иммуноферментного анализа повысило специфичность и чувствительность метода для определения большого количества антигенов и антител.

Результаты последовательно проведенных серологических тестов, показывающих наличие IgM, появление или значимое нарастания титра антител IgG (удвоение титра) в двух образцах сыворотки, взятых с минимальным интервалом в три недели, следует расценивать как доказательство манифестации вируса краснухи, даже если клинические патогномичные признаки инфекции отсутствуют.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Platelia™ Rubella IgM - это диагностическая система для качественного определения антител IgM к вирусу краснухи в сыворотке и плазме крови человека при помощи иммуноферментного анализа с захватом IgM на твердой фазе.

Антитела к μ -связям человека сорбированы на твердой фазе (лунки микропланшета). Состав из антигенов краснухи и моноклональных антител к антигенам вируса, меченных пероксидазой, используется в качестве конъюгата. Диагностика проводится в следующем порядке:

- **Этап 1**

Образцы пациентов, калибраторы и контроли разводят 1/21 и затем вносят в лунки микропланшета. Во время инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C антитела IgM, имеющиеся в образце, связываются с антителами к μ -связям, фиксированными на лунках микропланшета. По окончании инкубации IgG вместе с другими сывороточными белками удаляют промывками.

- **Этап 2**

Конъюгат (смесь вирусных антигенов и меченных пероксидазой моноклональных антител к вирусным антигенам) вносят в лунки микропланшета. При инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C конъюгат связывается со специфическими антителами IgM к вирусу, которые зафиксировались на микропланшете. Несвязанный конъюгат удаляют промывками по окончании инкубации.

- **Этап 3**

Наличие иммунных комплексов (антитела к μ -связям человека/IgM к вирусу краснухи/вирусный антиген/моноклональные антитела к вирусу краснухи, меченные пероксидазой) подтверждают добавлением ферментативного рабочего раствора в каждую лунку.

- **Этап 4**

После инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) ферментативную реакцию прерывают при помощи добавления 1N раствора серной кислоты. Оптическая плотность, полученная на спектрофотометре в диапазоне 450/620 нм, пропорциональна содержанию антител IgM к вирусу краснухи в образце сыворотки.

4. ОПИСАНИЕ НАБОРА

Набор реактивов рассчитан на проведение 96 тестов. Все реактивы предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

	Наименование	Химический состав реактива	Форма выпуска
R1	Микропланшет	Микропланшет: (готовый к использованию): 12 стрипов с 8 отламываемыми лунками, покрытыми антителами к μ -связям человека.	1
R2	Концентрированный промывочный раствор (20x концентрат)	Концентрированный промывочный раствор (20x концентрат): трис-NaCl-буферный раствор (pH 7.4), 2% Твин® 20 Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 70 мл
R3	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль: отрицательная человеческая сыворотка по антителам IgM к вирусу краснухи, отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R4	Калибратор	Калибратор: человеческая сыворотка положительная по антителам IgM к вирусу краснухи,	1 x 0.75 мл

		отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	
R5	Положительный контроль	Положительный контроль: положительная человеческая сыворотка по антителам IgM к вирусу краснухи, отрицательная по HBs антигену, антителам к ВИЧ1, ВИЧ2 и HCV. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.75 мл
R6a	Антиген	Антиген вируса краснухи: Лиофилизированные антигены вируса краснухи. Консервант : < 1.5% ProClin™ 300	4 x qs 8.0 мл
R6b	Конъюгат (101x концентрат)	Конъюгат (101x концентрат): Мышинные моноклональные антитела к вирусу краснухи, меченные пероксидазой. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.4 мл
R7	Растворитель	Растворитель для образцов и конъюгата (готовый к использованию): трис-NaCl-буферный раствор (pH 7.6), бычий сывороточный альбумин, 0.1% Твин® 20, фенол красный. Консервант: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 80 мл
R9	Хромоген ТМБ	Хромоген (готовый к использованию): 3.3'.5.5'тетраметилбензидин (< 0.1%), H ₂ O ₂ (<1%).	1 x 28 мл
R10	Стоп-реагент	Стоп-реагент (готовый к использованию): раствор серной кислоты 1N	1 x 28 мл
		Материал для запечатывания микропланшетов	4

Условия хранения и срок годности см. на упаковке.

5. ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от строгого соблюдения следующих стандартов «Надлежащей лабораторной практики»:

- Не используйте просроченные реактивы.
- Не смешивайте и не используйте во время одного исследования реактивы из разных партий.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Для промывочного раствора (маркировка R2: 20x концентрат, зеленого цвета), хромогена (маркировка R9: ТМБ бирюзового цвета) и стоп-реагента (маркировка R10: 1N красного цвета) допустимо использовать не только те партии реактивов, которые входят в набор, при условии, что используемые реактивы будут строго эквивалентны и в ходе одного исследования будут взяты из одного и того же комплекта.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ: Промывочный раствор (маркировка R2: 20х концентрат, зеленого цвета) допустимо смешивать с двумя другими промывочными растворами из различных наборов реактивов компании «Био-Рад» (маркировка R2: 10х концентрат голубого цвета или 10х концентрат оранжевого цвета). При этом растворы должны быть надлежащим образом восстановлены, и в ходе одного исследования их можно смешивать только один раз.

- Перед использованием подождите 30 минут для того, чтобы реактивы нагрелись до комнатной температуры (+18-30°C).
- Аккуратно восстанавливайте и разводите реактивы, избегая попадания каких-либо примесей.
- Не проводите исследование в присутствии химически активных паров (пары кислот, щелочей, альдегидов) и пыли, которые могут изменить активность ферментов в составе конъюгата.
- Используйте стеклянные емкости, тщательно вымытые и промытые деионизированной водой, однако предпочтительнее использовать одноразовый материал.
- Промывка микропланшета является важнейшим этапом исследования: соблюдайте рекомендуемое количество промывок и проверяйте, чтобы все лунки вначале были полностью заполнены, а затем полностью опорожнены. Ненадлежащая промывка может привести к ложным результатам.
- Следите за тем, чтобы поверхность микропланшета не высыхала в промежутке между промывкой и внесением реактивов.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для внесения конъюгата и ферментативного раствора.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к примесям металлов и их ионам. Поэтому не допускайте контакта металлических предметов с любыми растворами, содержащими конъюгат или хромоген.
- Раствор хромогена (R9) должен быть бесцветным. Появление голубого оттенка говорит о том, что реактив использовать нельзя и следует заменить.
- Используйте новый наконечник дозатора для каждого образца сыворотки.
- Проверяйте исправность дозаторов и другого инструментария.

ИНСТРУКЦИИ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Компоненты человеческого материала, используемые в составе реактивов, были проверены и являются отрицательными к наличию поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антител к гепатиту С (HCV) и к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ1 и ВИЧ2). Однако, поскольку ни один метод не может абсолютно гарантировать отсутствие инфекционных возбудителей, работайте с реактивами человеческого происхождения и с образцами сыворотки пациентов как с возможными источниками инфекционных заболеваний:

- Любой материал, в том числе и промывочные растворы, непосредственно контактирующий с образцами сыворотки и реактивами, содержащими человеческий материал, должен рассматриваться как возможный источник инфекционного заболевания.
- Работайте с реактивами и образцами в одноразовых перчатках.
- Не набирайте реактивы в дозатор ртом.
- Старайтесь не разливать образцы и растворы с сывороткой. Пролитую жидкость необходимо смыть осветлителем, разведенным до 10 %. Если пролилась кислота, ее следует вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем очистить 10%

раствором осветлителя и просушить поверхность фильтровальной бумагой. Материал, использованный для очистки, утилизируется в контейнер для загрязненных отходов.

- Образцы сыворотки пациентов, реактивы, содержащие человеческий материал, а также загрязненный материал и вещества должны быть утилизированы только после обеззараживания:
 - либо погружением в отбеливатель с итоговой 5 % концентрацией гипохлорита натрия на 30 минут.
 - либо при помощи автоклавирования при температуре 121°C в течение минимум 2 часов.

ОСТОРОЖНО: не ставьте в автоклав растворы, содержащие гипохлорит натрия.

- Избегайте попадания реактивов, в том числе и тех, которые считаются безопасными, на кожу и слизистые оболочки.
- Работать с химическими и биологическими отходами, а также проводить их утилизацию необходимо в соответствии со стандартами «Надлежащей лабораторной практики».
- Все реактивы в наборе предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

Осторожно:



Xi - Irritant

Некоторые реактивы содержат консервант ProClin™ 300 < 1.5%

R43: При контакте с кожей может вызвать раздражение.

S28-37: При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды с мылом. Работайте в специальных перчатках.

6. ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка и плазма крови (этилендиаминтетрауксусная кислота, гепарин, цитрат) являются рекомендуемыми типами образцов.

2. При работе с образцами крови, их исследовании и хранении соблюдайте следующие рекомендации:

- Забор образцов крови осуществляйте с соблюдением стандартных мер предосторожности при венепункции.
- Дождитесь завершения тромбообразования в сыворотке перед центрифугированием.
- Всегда держите пробирки закрытыми.
- После центрифугирования отделите сыворотку или плазму от тромба или эритроцитов в плотно закрывающуюся пробирку для хранения.
- При проведении анализа не позднее, чем в течение 7 дней, образцы могут храниться при температуре +2-8°C.
- Если в течение 7 дней анализ проведен не был, а также для транспортировки, образцы замораживают при температуре -20°C и ниже.
- Не используйте образцы, размороженные более 5 раз. После того, как замороженные образцы оттаяли, перед постановкой исследования их необходимо тщательно перемешать (при помощи вортекса).

3. Образцы с содержанием альбумина до 90 г/л или неконъюгированного билирубина до 100 мг/л, образцы с содержанием липидов, эквивалентных 36 г/л триолеина (триглицерида), а также гемолизированная сыворотка с гемоглобином до 10 г/л не влияют на результат.

4. Не нагревайте образцы.

7. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

7.1 Дополнительные материалы, не входящие в комплект

- Центрифуга/вортекс.
- Автоматический считыватель для микропланшета с фильтрами 450 нм и 620 нм (*).
- Инкубатор для микропланшета с термостатом, настроенным на $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (*).
- Автоматический, полуавтоматический или ручной промывочный аппарат для микропланшета (*).
- Стерильная дистиллированная или деионизированная вода.
- Одноразовые перчатки.
- Лабораторные или защитные очки.
- Фильтровальная бумага.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или с заданными параметрами дозаторы или мультидозаторы для дозирования и разведения объемов от 10 мкл до 1000 мкл, а также 1 мл, 2 мл и 10 мл.
- Мензурки емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1000 мл.
- Натрия гипохлорит (осветлитель) и натрия бикарбонат.
- Контейнер для биологически опасных отходов.
- Одноразовые пробирки.

(*) Для получения дополнительной информации по рекомендованному оборудованию Вы можете связаться с нашей технической службой.

7.2 Восстановление реактивов

- **R1:** Перед тем, как открыть контейнер, оставьте его на 30 минут при комнатной температуре ($+18-30^\circ\text{C}$). Выньте рамку-держатель, сразу же положите обратно в контейнер неиспользуемые стрипы и проверьте, чтобы там был влагопоглотитель. Тщательно запечатайте контейнер и поместите его на хранение при температуре $+2-8^\circ\text{C}$.
- **R2:** Разведите промывочный раствор R2 в дистиллированной воде 1/20 (например, 50 мл R2 и 950 мл дистиллированной воды), чтобы получить готовый к использованию промывочный раствор. Подготовьте 350 мл разведенного промывочного раствора на один 12-стриповый микропланшет для ручной промывки.
- **R3, R4, R5:** разведите 1/21 Раствором для разведения (R7) (пример: 300 мкл R7 + 15 мкл Калибратора или Контроля).
- **R6a:** Лиофилизированные Антигены вируса краснухи. Для 3 стрипов восстановите 1 флакон лиофилизированных антигенов, добавив 8 мл Растворителя (R7). Тщательно перемешайте. После разведения раствор антигенов (R6a+R7) должен быть абсолютно прозрачным.
- **R6 (R6a+R6b):** Рабочий раствор конъюгата: добавьте 80 мкл конъюгата (R6b) в каждый флакон восстановленных антигенов вируса краснухи (разведенный R6a). Тщательно перемешайте. Рабочий раствор конъюгата необходимо восстановить как минимум за 1 час до использования.

7.3 Хранение и срок годности открытых и/или восстановленных реактивов

Набор реактивов следует хранить при температуре $+2-8^\circ\text{C}$. При хранении набора при температуре $+2-8^\circ\text{C}$ все реактивы можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке на упаковке набора.

- **R1:** После вскрытия упаковки стрипы остаются стабильными в течение 8 недель при хранении при температуре $+2-8^\circ\text{C}$ в той же плотно закрытой упаковке (проверьте наличие влагопоглотителя).

(R2). Переверните планшет и, аккуратно постукивая по фильтровальной бумаге, стряхните остатки реагентов.

9. Сразу же добавьте 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) во все лунки. Перед использованием раствор следует аккуратно взболтать.

10. Накройте микропланшет адгезионным материалом, плотно прижмите, чтобы обеспечить герметичность. Сразу же поставьте микропланшет в водный термостат или в суховоздушный инкубатор на $1 \text{ час} \pm 5 \text{ минут}$ при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

11. По окончании второй инкубации снимите адгезионный материал и аспирируйте содержимое из всех лунок в контейнер для биологически активных отходов (содержащий натрия гипохлорит). Промойте микропланшет 4 раза 350 мкл Промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и, аккуратно постукивая по фильтровальной бумаге, стряхните остатки реагентов.

12. Быстро (**не на свету**) распределите в каждую лунку по 200 мкл Раствора хромогена (R9). **Реакция должна проходить в темноте в течение 30 ± 5 минут при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$).** При данной инкубации адгезионный материал не используется.

13. Остановите ферментативную реакцию, добавив 100 мкл стоп-реагента (R10) в каждую лунку. Придерживайтесь той же последовательности и схемы распределения, как и для ферментативного раствора.

14. Тщательно протрите рабочую поверхность сканера. На спектрофотометре определите оптическую плотность в диапазоне 450/620 нм в течение 30 минут после остановки реакции. Перед считыванием стрипы необходимо все время держать в темноте.

15. Перед описанием результатов проверьте, соответствуют ли друг другу данные считывания и схемы сканера и распределения образцов.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Вычисление порогового значения (ПЗ)

Пороговое значение (ПЗ) соответствует среднему значению показателей оптической плотности (ОП) пороговых значений повторов Контроля (R4):

$$\text{ПЗ} = \text{среднее ОП R4.}$$

8.2 Вычисление коэффициента отношения образца

Результат образца выражается через коэффициент отношения по следующей формуле:

$$\text{Коэффициент отношения} = \text{ОП образца} / \text{ПЗ образца}$$

8.3 Контроль качества

Процедура включает калибратор и контроли для каждого микропланшета для каждой постановки теста и анализ полученных результатов. Для верификации исследования должны быть соблюдены следующие критерии:

- Показатели оптической плотности:

$$\text{ПЗ} \geq 0.300$$

$$0.80 \times \text{ПЗ} < \text{ОП R4 повтор 1} < 1.20 \times \text{ПЗ}$$

$$0.80 \times \text{ПЗ} < \text{ОП R4 повтор 2} < 1.20 \times \text{ПЗ}$$

(Показатель ОП каждой пробы порогового значения контроля (R4) не должен отличаться более, чем на 20% от порогового значения).

- Коэффициенты отношения оптической плотности:

$$\text{Коэффициент отношения R3 (ОП R3 / ПЗ)} \leq 0.30$$

$$\text{Коэффициент отношения R5 (ОП R5 / ПЗ)} \geq 1.50$$

Если результат не соответствует данным критериям контроля качества, исследование следует повторить.

8.4 Интерпретация результатов

Коэффициент отношения	Результат	Интерпретация
Коэффициент < 0.80	Отрицательный	Образец считается химически неактивным в отношении наличия антител IgM к вирусу краснухи.
$0.80 \leq \text{Коэффициент} < 1.00$	Сомнительный	Образец считается сомнительным в отношении наличия антител IgM к вирусу краснухи. Результат следует подтвердить, взяв повторный анализ минимум через 3 недели после первого обследования.
Коэффициент ≥ 1.00	Положительный	Образец считается химически активным в отношении наличия антител IgM к вирусу краснухи.

8.5 Поиск и устранение ошибок

Недостоверные реакции или реакции с низкой повторяемостью обычно происходят в результате:

- Ненадлежащей промывки микропланшета.
- Попадания в отрицательные образцы примесей сыворотки или плазмы с высоким титром антител.
- Попадания в ферментативный раствор химических окислителей (осветлитель, ионы металлов...).
- Попадания примесей в раствор стоп-реагента.

9. ЭКСПЛУАТАЦИЯ

9.1 Распространенность

Распространенность антител IgM к вирусу краснухи по данным Platelia™ Rubella IgM (72851) оценивалась по выборке из 347 образцов, взятых у беременных женщин. 2 образца оказались положительными по наличию антител IgM к вирусу краснухи. По данным исследования с Platelia™ Rubella IgM, распространенность составила 0.6% (2/347).

Эксплуатация диагностической системы Platelia™ Rubella IgM осуществлялась на 2 базах, и всего было обработано 809 образцов, взятых у беременных женщин и доноров крови. На первой базе проводилось сравнительное исследование с Platelia™ Rubella IgM TMB (72922). На второй – сравнивались эксплуатационные параметры Platelia™ Rubella IgM с другой диагностической системой ИФА, имеющейся на рынке.

9.2 Сравнительное исследование (база 1)

Эксплуатационные параметры Platelia™ Rubella IgM оценивались по выборке из 399 образцов, распределенных по группам:

- 172 образца сыворотки доноров крови
- 151 образец сыворотки беременных женщин
- 76 образцов сыворотки, положительных по антителам IgM к вирусу краснухи из коммерческой выборки.

		Platelia™ Rubella IgM TMB (72922)			
		Отрицательный	Сомнительный	Положительный	Всего
Platelia™ Rubella IgM (72851)	Отрицательный	319	0	1	320
	Сомнительный*	2	0	0	2
	Положительный	0	0	77	77
	Всего	321	0	78	399

Совокупное соответствие 396 / 399 99.25% [ДИ 95% = 97.82% - 99.84%]

Относительная специфичность 319 / 321 99.38%* [ДИ 95% = 97.77 - 99.92%]

Относительная чувствительность 77 / 78 98.72% [ДИ 95% = 93.06 - 99.97%]

**сомнительные результаты оценивались как положительные*
[ДИ 95%] = 95% доверительный интервал.

Также при помощи двух диагностических наборов было протестировано 60 образцов сыворотки после 7 отсроченных вакцинаций (использовались вакцины двух типов): выявление антител IgM к вирусу краснухи в обоих случаях совпало.

9.3 Параметры эксплуатации (база 2)

Эксплуатационные параметры Platelia™ Rubella IgM оценивались по выборке из 350 образцов, распределенных по группам:

- 47 детей в возрасте от 15 лет и младше (27 девочек и 20 мальчиков)
- 299 взрослых (298 женщин – беременных или только что родивших – и 1 мужчина)
- 1 образец сыворотки из Французского национального исследования по контролю качества

Результаты сравнивали с полученными по другой диагностической системе ИФА, имеющейся на рынке и взятой в качестве эталона.

		Диагностическая система ИФА			
		Отрицательный	Сомнительный	Положительный	Всего
Platelia™ Rubella IgM (72851)	Отрицательный	344	0	0	344
	Сомнительный*	1	0	0	1
	Положительный	0	1	4	5
	Всего	345	1	4	350

Относительная специфичность 344 / 345 99.71%* [ДИ 95% = 98.40 – 99.99%]

**сомнительные результаты оценивались как положительные*
[ДИ 95%] = 95% доверительный интервал.

Из 5 положительных сывороток:

- 4 конкордантных положительных образца были взяты у одного человека в разное время,
- Несовпадающий положительный образец был подтвержден по данным третьей диагностической системы ИФА, имеющейся на рынке, и соответствовал анализу, взятому через 4 месяца после вакцинации.

9.4 Перекрестная реактивность

Исследование на выявление антител к вирусу краснухи с помощью Platelia™ Rubella IgM (72851) и Platelia™ Rubella IgM TMB (72922) проводилось по выборке из 212 образцов, включая 164 образца, положительных по ЦМВ, токсоплазмозу, ЭБВ, вирусу герпеса, вирусу Варицелла-Зостер, эпидемическому паротиту, кори и ВИЧ, а также 48 образцов, положительных по ревматоидному фактору, аутоантителам, гетерофильным антителам и миеломной болезни.

Из этих образцов 1 оказался несовпадающим положительным по IgM к ЦМВ, и 6 образцов были расценены как положительные или сомнительные по ревматоидному фактору по данным обеих систем. Четыре из этих 6 образцов оказались отрицательными по данным других наборов ИФА, имеющихся в коммерческой продаже.

9.5 Точность

- Внутриааналитическая сходимость (повторяемость)

Для оценки повторяемости химического анализа один отрицательный и три положительных образца были протестированы 30 раз в ходе одного исследования. Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца) определяли для каждого образца. Ниже приведено среднее значение коэффициента отношения, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) для каждого образца:

Внутрианалитическая сходимость (повторяемость)

N=30	Отрицательные образцы	Слабо положительные образцы	Положительные образцы	Резко положительные образцы
Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца)				
среднее	0.07	1.73	2.51	4.06
SD	0.002	0.03	0.06	0.11
% CV	2.7%	1.8%	2.5%	2.7%

- Межаналитическая сходимость (воспроизводимость)

Для оценки воспроизводимости химического анализа четыре образца (один отрицательный и три положительных) были протестированы в повторах в ходе двух исследований в день в течение 20 дней. Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца) определяли для каждого образца. Ниже приведены среднее значение коэффициента отношения, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) для каждого образца:

Межаналитическая сходимость (воспроизводимость)

N=80	Отрицательные образцы	Слабо положительные образцы	Положительные образцы	Резко положительные образцы
Коэффициент отношения (ОП образца/ПЗ образца)				
среднее	0.04	1.19	2.24	3.60
SD	0.005	0.03	0.06	0.10
% CV	12.7%	2.8%	2.6%	2.8%

10. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Диагноз краснухи может быть поставлен только по совокупности клинических и лабораторных данных. Результаты единственного анализа с наличием титра антител IgM к вирусу краснухи не достаточно для подтверждения течения данной инфекции.

Диагноз текущего инфекционного заболевания подтверждается только при наличии полной информации о пациенте, включая клинические и лабораторные данные (значимое нарастание антител IgM к вирусу краснухи по 2 образцам сыворотки, взятым с интервалом в 3 недели и обработанным одновременно; наличие диагностически значимого титра антител IgM к вирусу краснухи; низкая авидность IgG).

Наличие IgM не является достаточным подтверждением диагноза текущей краснухи, поскольку IgM могут циркулировать в крови в течение нескольких месяцев и даже лет после перенесенного заболевания. При обнаружении IgM необходимо провести количественный анализ антител IgG к вирусу краснухи, а также отсроченный анализ динамики антител к вирусу как минимум еще в одном образце сыворотки через 3 недели.

Если анализ был взят в слишком ранние сроки первичной инфекции, антитела IgM к краснухе могут еще не появиться. При сохраняющихся подозрениях, необходимо сделать повторный анализ через 3 недели и еще раз определить титр IgM.

Образцы, положительные по ревматоидному фактору, могут давать ложноположительные результаты.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все промышленные реактивы производятся в соответствии с нашей Системой контроля качества от момента заготовки сырья до выпуска готовой формы. Каждое наименование проходит контроль качества и поступает в продажу только при соответствии

установленным критериям приемки. Компания «Био-Рад» располагает документацией о производстве и контроле качества каждого конкретного наименования.

12. ЛИТЕРАТУРА

См. инструкцию на английском языке.

- **R2:** После разведения Промывочный раствор можно хранить 2 недели при температуре +2-30°C. После вскрытия концентрированный Промывочный раствор, хранящийся при +2-30°C и без примесей, остается устойчивым до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- **R3, R4, R5, R6b, R7:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при температуре +2-8°C реактивы остаются стабильными до 8 недель.
- **R6 (R6a+R6b):** После разведения рабочий раствор конъюгата остается стабильным до 6 часов при комнатной температуре (+18-30°C) или в течение 2 недель при температуре +2-8°C.
- **R9:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при +2-8°C реактив остается стабильным до 8 недель.
- **R10:** После вскрытия, в отсутствии примесей и при хранении при +2-8°C реактив остается стабильным до истечения срока годности, указанного на этикетке.

7.4 Порядок работы

Строго соблюдайте порядок химического анализа, а также стандарты «Надлежащей лабораторной практики».

Перед использованием реактивы должны нагреться до комнатной температуры (20 - 30°C).

При отламывании и работе с лунками соблюдайте особую аккуратность. Используйте калибратор и контроли при каждой постановке анализа для подтверждения результатов исследования.

1. Внимательно составьте план распределения и маркировки калибратора, контролей и образцов сыворотки пациентов.
2. Подготовьте разведение Промывочного раствора (R2) [см. Раздел 7.2].
3. Выньте рамку-держатель и стрипы (R1) из защитной упаковки [см. Раздел 7.2].
4. Подготовьте Рабочий раствор конъюгата R6 (R6a+R6b) [см. Раздел 7.2].
5. В индивидуально промаркированных пробирках разведите Калибратор (R4), Контроли (R3, R5) и образцы пациентов (S1, S2...) Растворителем (R7) до концентрации 1/21: 300 мкл Растворителя (R7) и 15 мкл образца. Перемешайте при помощи вортекса разведенные образцы.
6. Строго соблюдайте указанную ниже последовательность, вносите в каждую ячейку по 200 мкл разведенного калибратора, контролей и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5	S13									
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

7. Накройте микропланшет адгезионным материалом, плотно прижмите, чтобы обеспечить герметичность. Сразу же поставьте микропланшет в водный термостат или в суховоздушный инкубатор на 1 час $\pm$ 5 минут при 37°C $\pm$ 1°C.

8. По окончании первой инкубации снимите адгезионный материал и аспирируйте содержимое из всех лунок в контейнер для биологически активных отходов (содержащий натрия гипохлорит). Промойте микропланшет 4 раза 350 мкл Промывочного раствора

Platelia™ CMV IgG 72810

96 тестов

**Обнаружение антител класса IgG к цитомегаловирусу в
сыворотке крови или плазме человека
иммуноферментным методом**

1 – ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Platelia™ CMV IgG представляет собой разновидность непрямого метода твердофазного иммуноферментного анализа, предназначенную для обнаружения антител класса IgG к цитомегаловирусу в сыворотке крови или плазме человека.

2 – КЛИНИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

Цитомегаловирус человека (ЦМВ) – распространенный вирус, который был обнаружен во всех географических районах мира у представителей всех социально-экономических групп. ЦМВ принадлежит к семейству вирусов герпеса и переносится через биологические жидкости при тесном межличностном контакте (через мочу, слюну, молоко матери, кровь, слезы, сперму и вагинальные секреты). После заражения ЦМВ может оставаться в организме зараженных пациентов в неактивном состоянии в течении нескольких лет, а затем повторно активироваться, вызывая рецидивирующую инфекцию и риск заражения других людей.

Первичная инфекция является результатом разных способов передачи и характерна для различных периодов жизни (врожденные инфекции, послеродовые инфекции). После фазы скрытой активности повторная инфекция может возникнуть вследствие нового заражения экзогенным вирусом или активации латентного вируса.

Заражение 50-80% населения происходит до достижения совершеннолетия, но в большинстве случаев инфекция протекает бессимптомно, причем только у 2% пациентов наблюдаются атипичные симптомы, такие как лихорадка, астения, боли в мышцах или суставах. Однако инфицирование ЦМВ может оказаться опасным для беременных женщин, новорожденных, а также для людей с ослабленным иммунитетом.

Во время беременности от 1 до 3% женщин получают заражение ЦМВ, а внутриутробная инфекция путем плацентарной диффузии наблюдается у 40-50% пациенток. 95% случаев внутриутробного инфицирования протекают бессимптомно, но оставшиеся 5% характеризуются серьезнейшими осложнениями: гепатоспленомегалией, микроцефалией, гидроцефалией, преждевременными родами, задержкой психомоторной активности и внутриутробной смертью плода. В 10% случаев бессимптомного протекания инфекции у новорожденных наблюдаются запоздалые осложнения, такие как частичная или полная глухота или слепота.

У пациентов с ослабленным иммунитетом (вследствие СПИДа, пересадки органов, лимфопролиферативных заболеваний или рака) с диссеминированной и/или висцеральной инфекцией связаны серьезные осложнения: спленомегалия, хориоретинит, гепатит, пневмония, миокардит, энцефалит. Для таких пациентов инфицирование может привести к летальному исходу.

Спустя несколько недель после заражения ЦМВ иммунная реакция приводит к появлению сначала особых антител класса IgM, а затем особых антител класса IgG. Серологическая диагностика инфекции ЦМВ проявляется в виде сероконверсии либо значительного увеличения титра IgG. Обнаружение специфических антител к ЦМВ класса IgG является полезным при диагностировании первичной инфекции и определении иммунного статуса пациентов.

3 – ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Platelia™ CMV IgG – это тест, разработанный для обнаружения и титрования антител класса IgG к цитомегаловирусу в сыворотке крови или плазме человека с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа.

Инактивированный антиген ЦМВ используется для сенсibilизации микропланшета. В качестве конъюгата используется меченное пероксидазой поликлональное антитело, характерное для гамма-цепей человека (анти-IgG). Тест состоит из следующих этапов:

- **Этап 1**

Образцы пациентов и калибраторы разбавляются в соотношении 1/21 и затем распределяются по лункам микропланшета. Во время 1-часовой инкубации при температуре 37°C антитела к ЦМВ класса IgG, находящиеся в образце, вступают в связь с антигеном ЦМВ на лунках микропланшета. По истечении инкубации несвязанные неспецифические антитела и остальные серопротейны удаляются во время промывки.

- **Этап 2**

Конъюгат (меченное пероксидазой поликлональное антитело, характерное для гамма-цепей человека) добавляется в лунки микропланшета. Во время 1-часовой инкубации при температуре 37°C меченое антитело вступает в связь с сывороточным иммуноглобулином класса G, захваченным антигеном ЦМВ. Несвязанный конъюгат удаляется во время промывки в конце инкубации.

- **Этап 3**

Наличие иммунных комплексов (включающих антиген ЦМВ, антитела к ЦМВ класса IgG, конъюгат анти-IgG) демонстрируется добавлением в каждую лунку ферментного проявляющего раствора.

- **Этап 4**

После инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) ферментативная реакция прерывается добавлением однонормального раствора серной кислоты. Показатели оптической плотности, полученные при помощи спектрофотометра, настроенного на 450/620 нм, пропорциональны количеству антител к ЦМВ класса IgG, присутствующих в образце.

4 – ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

Реагенты предоставляются в количестве, достаточном для выполнения 96 анализов. Все реагенты предназначены для проведения диагностики исключительно в лабораторных условиях.

Маркировка		Тип реагента	Наличие
R1	Микропланшет	Микропланшет: (готов к использованию) – 12 стрипов с 8 отрывными лунками,	1

		сенсibilизированными инактивированным антигеном ЦМВ	
R2	Концентрированный промывочный раствор (20х)	Концентрированный промывочный раствор (20х): - Буферный раствор Tris-NaCl (pH 7.4) - 2%-ый раствор Tween® 20 - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 70 мл
R3	Калибратор 0	Калибратор 0: - Сыворотка крови человека, дающая отрицательный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG, а также на наличие антигена HBs*, anti-HIV1**, anti-HIV2 и anti-HCV*** - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R4a	Калибратор 0.4	Калибратор 0.4 ЕОП/мл: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG и отрицательный результат на наличие антигена HBs, anti-HIV1, anti-HIV2 и anti-HCV - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R4b	Калибратор 1	Калибратор 1 ЕОП/мл: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG и отрицательный результат на наличие антигена HBs, anti-HIV1, anti-HIV2 и anti-HCV - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R4c	Калибратор 4	Калибратор 4 ЕОП/мл: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG и отрицательный результат на наличие антигена HBs, anti-HIV1, anti-HIV2 и anti-HCV - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R4d	Калибратор 10	Калибратор 10 ЕОП/мл (готов к употреблению): - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG и отрицательный результат на наличие	1 x 0,75 мл

* HBs – гепатит В

** HIV - ВИЧ

*** HCV – вирус гепатита С

		антигена HBs, anti-HIV1, anti-HIV2 и anti-HCV - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	
R6	Конъюгат	Конъюгат (51х): - Козлиное поликлональное антитело к гамма-цепям человека, соединенное с пероксидазой хрена (goat polyclonal antibody to human gammachains coupled to horseradish peroxidase) - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,7 мл
R7	Разбавитель	Раствор для разведения образцов и конъюгата (готов к употреблению): - Буферный раствор Tris-NaCl - Говяжий альбумин - Глицерин - 0,1%-ый раствор Tween® 20 - Краситель феноловый красный - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 80 мл
R9	Хромоген ТМБ	Хромоген (готов к употреблению) - 3,3',5,5'-тетраметилбензидиновый раствор (< 0.1%), H ₂ O ₂ (<1.0%)	1 x 28 мл
R10	Стоп-раствор	Останавливающий раствор (готов к употреблению): - однонормальный раствор серной кислоты	1 x 28 мл
		Клейкая пленка	4

Условия хранения и дату истечения срока годности смотрите в указаниях на упаковке.

5 – ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Надежность результатов зависит от корректного применения следующих Правил работы в лаборатории:

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте и не применяйте совместно реагенты из упаковок с различными номерами партий в ходе одной серии тестов.

Примечание: Вы можете использовать промывочный раствор (R2, помечен зеленым цветом как 20х), хромоген (R9, помечен* бирюзовым цветом как ТМБ) и стоп-раствор (R10, помечен* красным цветом как 1N) из других партий, а не из исходной, при условии, что сами реагенты, используемые в одной серии тестов, принадлежат одной партии.*

Примечание: помимо этого, промывочный раствор (R2, помеченный зеленым цветом как 20х) можно смешать с 2 другими промывочными растворами из различных наборов реагентов Bio-Rad (R2, помеченным* синим цветом как 10х или оранжевым*

* На пробирочной этикетке

цветом как 10х) при условии правильного растворения и того, что в рамках одной серии тестов используется одна и та же смесь.

- Перед использованием подождите 30 минут, чтобы реагенты достигли комнатной температуры (от +18 до +30°C).
- Аккуратно произведите растворение или разбавление реагентов, остерегаясь любого загрязнения.
- Не проводите тест при наличии реактивных паров (кислотных, щелочных, альдегидных) или пыли, которые могут повлиять на ферментную активность конъюгата.
- Используйте стеклянные контейнеры, которые прошли тщательную промывку и очистку дистиллированной водой, или, предпочтительнее, материалы одноразового применения.
- Промывка микропланшета – крайне важный этап процедуры: выполните рекомендованное число промывочных циклов и убедитесь, что все лунки сначала полностью заполнены, а затем полностью опорожнены. Некорректная промывка может привести к искажению результатов.
- Микропланшет не должен быть сухим в период между окончанием промывочного цикла и добавлением реагентов.
- Не используйте один и тот же флакон для конъюгата и проявляющего раствора.
- Ферментная реакция чрезвычайно чувствительна к любым металлам или ионам металлов. Следовательно, не допускается контакт металлических предметов с различными растворами, содержащими конъюгат или хромоген.
- Раствор хромогена (R9) должен быть бесцветным. Появление голубоватого оттенка указывает на то, что реагент непригоден для использования и должен быть заменен.
- При внесении каждого образца используйте новый дозирующий наконечник.
- Тщательно проверяйте наконечники и остальное оборудование для обеспечения корректного выполнения операций и повышения точности результатов.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ОХРАНЕ ТРУДА И ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Результаты тестирования показали, что исходный человеческий материал, использовавшийся при приготовлении реагентов, не реагирует с поверхностным антигеном гепатита В (HBs Ag), антителами к вирусу гепатита С (anti-HCV) и к вирусу иммунодефицита человека (anti-HIV1 и anti-HIV2). Поскольку ни один метод не может с абсолютной точностью гарантировать отсутствие возбудителей инфекции, обращайтесь с реагентами человеческого происхождения и образцами пациентов как с потенциальными носителями инфекционных заболеваний:

- Любые материалы, включая промывочные растворы, которые участвуют в прямом контакте с образцами и реагентами, содержащими элементы человеческого происхождения, следует рассматривать как возможные носители инфекционных заболеваний.
- При работе с образцами и реагентами всегда надевайте перчатки одноразового использования.
- Не производите пипеттирование при помощи рта.
- Избегайте разбрызгивания образцов или растворов. Проливы следует обработать дезинфицирующим средством (жавелевой водой), растворенным в воде в пропорции 1:10. В случае пролива кислоты сначала нужно ее нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем обработать дезинфицирующим средством (жавелевой водой), растворенным в воде в пропорции 1:10, и промокнуть фильтровальной бумагой. Материал, использовавшийся при очистке, должен быть утилизирован в специальном контейнере для контаминированных отходов.

- Образцы пациентов и реагенты, содержащие материалы человеческого происхождения, а также все зараженные материалы и продукты следует утилизировать только после проведения обеззараживания:
 - или помещением их в дезинфицирующий раствор (жавелевую воду) с конечной концентрацией жавелевой воды 5% на 30 минут,
 - или автоклавированием при температуре 121°C не менее 2 часов.

ВНИМАНИЕ: не помещайте в автоклав растворы, содержащие жавелевую воду.

- Избегайте контакта реагентов, включая признанные безопасными, с кожей и слизистыми оболочками.
- Работа с химическими и биологическими отходами, а также их утилизация должны проводиться согласно Правилам работы в лаборатории.
- Все реагенты в наборе предназначены для диагностирования исключительно в лабораторных условиях.



Осторожно: некоторые реагенты содержат < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300:

R43: Может вызвать аллергическую реакцию при попадании на кожу.

S28-37: После контакта с кожей немедленно промойте соответствующий участок большим количеством воды и мыла. Работайте в перчатках.

Раздражающее вещество

6 – ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка крови и плазма (ЭДТК, гепарин или цитрат) являются рекомендуемыми типами образцов.
2. Ознакомьтесь с нижеследующими указаниями к обработке и хранению образцов крови:
 - Выполните забор всех образцов крови, соблюдая меры предосторожности при проведении венопункции.
 - В случае сыворотки крови дайте образцам полностью свернуться перед центрифугированием.
 - Пробирки должны быть все время запечатаны.
 - После центрифугирования отделите сыворотку или плазму от сгустков или скоплений эритроцитов и поместите ее в плотно закрытую пробирку на хранение.
 - Образцы можно хранить при температуре +2-8°C, если тест будет проведен в течение 7 дней.
 - В случае, если тест не будет проводиться в течение ближайших 7 дней, либо для перевозки заморозьте образцы при температуре -20°C или ниже.
 - Не используйте образцы, которые проходили размораживание более 5 раз. После размораживания образцы следует тщательно встряхнуть перед тестированием.
3. На результаты не влияет содержание в образцах альбумина в количестве 90 г/л или свободного билирубина (100 мг/л), липемических образцах – триолеина (триглицерида) в количестве 36 г/л, гемолизированных образцах – гемоглобина (10 г/л).
4. Не нагревайте образцы.

7 – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

7.1 Требуемое, но не входящее в набор оборудование

- «Вихревой» смеситель.
- Считывающее устройство для микропланшетов, оборудованное фильтрами по 420 и 620 нм (*).
- Инкубатор для микропланшетов, настроенный на температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (*).
- Автоматическое, полуавтоматическое или ручное промывочное устройство для микропланшетов (*).
- Стерильная дистиллированная или деминерализованная вода.
- Одноразовые перчатки.
- Фильтровальная бумага.
- Пипетки или многоканальные пипетки (автоматические или полуавтоматические, регулируемые или нерегулируемые), которые могут отмерять и дозировать объемы от 10 до 1000 мкл, а также 1 мл, 2 мл и 10 мл.
- Градуированные цилиндры емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1000 мл.
- Гипохлорит натрия (жавелевая вода) и бикарбонат натрия.
- Емкость для контаминированных отходов.
- Одноразовые пробирки.

7.2 Приготовление (растворение) реагентов

- **R1:** Перед тем, как открывать пакет, подержите его в течение 30 минут при комнатной температуре ($+18-30^\circ\text{C}$). Извлеките лоток механизма для транспортировки планшетов, затем незамедлительно поместите неиспользованные стрипы обратно в пакет и проверьте наличие влагопоглотителя. Тщательно закройте пакет и верните на место хранения (при температуре $2-8^\circ\text{C}$).
- **R2:** Разведите промывочный раствор R2 в дистиллированной воде в соотношении 1/20 (например, 50 мл R2 и 950 мл дистиллированной воды) для получения готового к применению промывочного раствора. Приготовьте 350 мл разведенного промывочного раствора на один планшет из 12 стрипов при ручной промывке.
- **R3, R4a, R4b, R4c, R4d:** Разведите в разбавителе (R7) в пропорции 1/21 (например, 300 мкл разбавителя R7 и 15 мкл калибратора).
- **R6+R7:** Конъюгат (R6) является концентрированным веществом (с кратностью 51) и должен быть гомогенизирован перед использованием. Разведите его в разбавителе (R7) в пропорции 1/51. В расчете на один планшет разведите 0,5 мл конъюгата (R6) в 25 мл разбавителя (R7). Десятая часть от данных объемов составляет объем, требуемый на каждый отдельный стрип.

7.3. Хранение и пригодность открытых и/или растворенных реагентов

Набор следует хранить при температуре $+2-8^\circ\text{C}$. Если набор держать при данной температуре до открытия, то каждый его компонент можно использовать до даты истечения срока годности, указанной на наружной этикетке набора.

(*) Обращайтесь в наш Технический отдел за дополнительной информацией о рекомендованном оборудовании.

- **R1:** После открытия стрипы сохраняют устойчивое состояние в течение 8 недель при условии хранения в температурном режиме +2-8°C в том же плотно закрытом пакете (проверьте наличие влагопоглотителя).
- **R2:** После разведения промывочный раствор можно хранить в течение 2 недель при температуре +2-30°C. После открытия концентрированный промывочный раствор, хранившийся при температуре +2-30°C, в отсутствие заражения остается устойчивым до даты истечения срока годности, указанной на этикетке.
- **R3, R4a, R4b, R4c, R4d, R6, R7:** После открытия в отсутствие заражения реагенты, хранящиеся при температуре +2-8°C, остаются устойчивыми до 8 недель.
- **R6+R7:** После разведения рабочий раствор конъюгата сохраняет устойчивость в течение 8 часов при комнатной температуре (+18-30°C) или 24 часов при температуре +2-8°C.
- **R9:** После открытия в отсутствие заражения реагент будет сохранять устойчивость до 8 недель при его хранении в температурном режиме +2-8°C.
- **R10:** После открытия в отсутствие заражения реагент будет сохранять устойчивость до даты истечения срока годности, указанной на этикетке, при его хранении в температурном режиме +2-8°C.

7.4 Процедура

Строго соблюдайте установленный порядок проведения анализа и Правила работы в лаборатории.

Перед началом работы дайте реагентам достичь комнатной температуры (18-30°C).

Использование отрывных лунок требует особого внимания.

В ходе каждой серии тестов используйте все калибраторы для подтверждения результатов исследования.

1. Тщательно продумайте план распределения и идентификации калибраторов и образцов пациентов.
2. Приготовьте разбавленный промывочный раствор (R2) [Смотрите Раздел 7.2].
3. Извлеките раму и стрипы (R1) из защитной упаковки [Смотрите Раздел 7.2].
4. В специально обозначенных пробирках разведите калибраторы R3, R4a, R4b, R4c и R4d, а также образцы пациентов (S1, S2...) в разбавителе (R7) в пропорции 1/21: 300 мкл разбавителя (R7) и 15 мкл образца [Смотрите Раздел 7.2]. Перемешайте образцы в вихревом смесителе.
5. Строго следуя приведенной ниже последовательности действий, внесите в каждую лунку 200 мкл разведенных калибраторов и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S4	S12									
B	R4a	S5										
C	R4b	S6										
D	R4c	S7										
E	R4d	S8										
F	S1	S9										
G	S2	S10										
H	S3	S11										

6. Накройте микропланшет клейкой пленкой, прижимая ее ко всей поверхности для обеспечения герметичности. Сразу после этого произведите инкубацию микропланшета в термостатически регулируемой водяной бане или в сухом инкубаторе в течение часа ± 5 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
7. Перед окончанием первого инкубационного периода приготовьте рабочий раствор конъюгата (R6+R7) [Смотрите Раздел 7.2].
8. В конце первого инкубационного периода снимите клейкую пленку. Выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду). Промойте микропланшет 4 раза с использованием 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
9. Сразу после этого внесите 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) в каждую лунку. Перед использованием раствор следует аккуратно взболтать.
10. Накройте микропланшет клейкой пленкой, прижимая ее ко всей поверхности для обеспечения герметичности. Сразу после этого произведите инкубацию микропланшета в термостатически регулируемой водяной бане или в сухом инкубаторе в течение часа ± 5 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
11. В конце второго инкубационного периода снимите клейкую пленку. Выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду). Промойте микропланшет 4 раза с использованием 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
12. **Вдали от яркого света** быстро внесите 200 мкл раствора хромогена (R9) в каждую лунку. **Выполните инкубацию микропланшета в темноте при комнатной температуре (+18-30°C) в течение 30 ± 5 минут.** Не используйте клейкую пленку во время этой стадии инкубации.
13. Прекратите ферментативную реакцию, добавив 100 мкл стоп-раствора (R10) в каждую лунку. Внесение выполните в той же последовательности и в том же ритме, что и для раствора субстрата.
14. Тщательно протрите дно микропланшета. С помощью сканера микропланшетов считайте значение оптической плотности каждой лунки при длине волны 450/620 нм (стандартный фильтр с длиной волны 620 нм) в течение 30 минут с момента прекращения реакции (стрипы всегда следует держать вдали от прямого света перед процедурой считывания).
15. Проверьте соответствие между выходными данными считывающего устройства и графиком внесения растворов на микропланшет перед расшифровкой результатов.

8 – ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Построение графика кривой калибровки

Не существует препарата международного стандарта для измерения количества антител anti-CMV IgG. Анализ Platelia™ CMV IgG имеет стандарт качества по Принятому международному стандарту по препаратам ВОЗ 1995.

Наличие и концентрация антител к ЦМВ класса IgG определяется методом сравнения оптической плотности (ОП) текущего образца в условных единицах оптической плотности на миллилитр (ЕОП/мл) с концентрацией калибраторов кривой калибровки.

Начертите кривую калибровки [ОП = функция (ЕОП/мл)], отмечая значения ОП для калибраторов R3, R4a, R4b, R4c и R4d на вертикальной оси (оси Y) и затем соответствующие концентрации в ЕОП/мл на горизонтальной оси (оси X). Для каждого тестируемого образца вычислите титр антител к ЦМВ класса IgG, определив по полученной кривой калибровки соответствующую концентрацию для измеренной ОП.

8.2 Контроль качества

Используйте калибраторы на каждом микропланшете всякий раз при проведении теста и с их помощью анализируйте полученные результаты. Для подтверждения анализа должны быть удовлетворены следующие критерии:

- **Значения оптической плотности**
 $\text{ОП R4a} \geq 0.150$
 $\text{ОП R4b} \geq 0.300$
 $\text{ОП R4d} > \text{ОД R4c}$
- **Соотношение оптических плотностей**
 $\text{ОП R4a} / \text{ОП R3} \geq 3.50$
 $\text{ОП R4b} / \text{ОП R4a} \geq 1.50$
 $\text{ОП R4c} / \text{ОП R4b} \geq 1.50$

Если данные критерии не выполнены, следует провести ещё одну серию тестов.

8.3 Интерпретация результатов

Титр антител к ЦМВ (ЕОП/мл)	Результат	Интерпретация
Титр < 0.25 ЕОП/мл	Отрицательный	Отрицательный или сомнительный результат указывает на отсутствие приобретенного иммунитета, но не может исключить недавнее инфицирование. Если возникает подозрение на такое инфицирование, следует повторить тестирование пациента 2 недели спустя.
$0.25 \text{ ЕОП / мл} \leq \text{Титр} < 0.5 \text{ ЕОП / мл}$	Сомнительный	
Титр ≥ 0.5 ЕОП / мл	Положительный	Положительный результат, как правило, указывает на прошедшую инфекцию. Однако недавнее инфицирование также не может быть исключено, особенно если в образце присутствуют антитела к ЦМВ класса IgM.

Если возникло подозрение на недавнее инфицирование, то для подтверждения диагноза могут пригодиться другие серологические тесты, например, измеряющие авидитет антител класса IgG.

При концентрации свыше 4 ЕОП/мл наблюдается большой разброс титров.

Образцы с концентрацией, превышающей наибольший калибратор кривой калибровки, можно развести в разбавителе R7 для получения результата в пределах

диапазона линейности анализа. В такой ситуации конечная концентрация достигается умножением измеренного результата на степень разбавления.

8.4 Руководство по поиску и устранению неисправностей

Неподтвержденные или неповторяющиеся реакции, как правило, вызваны:

- Некорректной промывкой микропланшетов
- Контаминированием отрицательных образцов сывороткой крови или плазмой с высоким титром антител.
- Контаминированием раствора субстрата химическими окислителями (дезинфектантами, ионами металлов...).
- Контаминированием стоп-раствора.

9 – ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Эксплуатационные характеристики анализа Platelia™ CMV IgG оценивались на основе исследования 1096 образцов, взятых у беременных женщин и доноров, проведенного в 2 лабораториях.

9.1 Распространенность

Распространенность антител к ЦМВ класса IgG при использовании анализа Platelia™ CMV IgG была оценена на основе 300 образцов, взятых у беременных женщин, проживающих в районе Парижа (Франция). 145 образцов дали положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG. Распространенность, полученная по результатам анализа Platelia™ CMV IgG, признана равной 48.3% (145/300).

9.2 Специфичность

Относительная специфичность была оценена в 2 лабораториях, расположенных во Франции, на основе 490 образцов, из которых

- 61 содержали сыворотку крови доноров
- 429 – сыворотку крови беременных женщин

Результаты прошли сравнение с результатами, полученными при использовании коммерческого ИФА-теста* в качестве эталона.

Группа тестируемых пациентов / клиника		Количество образцов сыворотки крови	Отрицательные	Сомнительные	Положительные	Специфичность
Клиника 1	Беременные женщины	81	81	0	0	100.0% (81/81) [96.3%-100.0%]
	Доноры	61	61	0	0	100.0% (61/61) [95.2%-100.0%]
Клиника 2	Беременные женщины	348	348	0	0	100.0% (348/348) [99.1%-100.0%]
Всего		490	490	0	0	100.0%

* ИФА – иммуноферментный анализ

					(490/490) [99.4%-100.0%]
--	--	--	--	--	-----------------------------

[ДИ 95%] = 95%-ый доверительный интервал.

9.3. Чувствительность

Относительная чувствительность была оценена на основе 606 образцов в 2 лабораториях, расположенных во Франции, из них:

- 136 образцов сыворотки крови, взятых у доноров
- 470 образцов сыворотки крови, взятых у беременных женщин

Результаты прошли сравнение с результатами, полученными при использовании коммерческого ИФА-теста* в качестве эталона.

Группа тестируемых пациентов / клиника		Количество образцов сыворотки крови	Отрица тельные	Сомнител ьные**	Положител ьные	Специфичность
Клини ка 1	Беременные женщины	123	0	2	121	98.4% (121/123) [94.2%-99.8%]
	Доноры	136	3	1	132	97.1% (132/136) [92.6%-99.2%]
Клини ка 2	Беременные женщины	347	0	4	343	98.8% (343/347) [97.1%-99.7%]
Всего		606	3	7	596	98.4% (596/606) [97.0%-99.2%]

[ДИ 95%] = 95%-ый доверительный интервал.

9.4. Перекрестная реактивность

На наличие антител к ЦМВ класса IgG был протестирован набор из 103 образцов, включая 77 образцов, показавших положительный результат на наличие токсоплазмоза, краснухи, вируса Эпштейна-Барра, вируса простого герпеса, вируса ветряной оспы, свинки и ВИЧ, и 26 образцов, показавших положительный результат на наличие ревматоидного фактора, аутоиммунных антител и гетерофильных антител. При тестировании помимо анализа Platelia™ CMV IgG использовался коммерческий ИФА-тест* в качестве эталона.

Среди перечисленных образцов 37 дали отрицательный результат, аналогичный полученному при использовании ИФА-набора для сравнения, что подтверждает невозможность потенциальных перекрестных реакций.

9.5. Точность

Точность в пределах серии тестов (воспроизводимость):

* ИФА – иммуноферментный анализ

** Сомнительные результаты рассматривались как отрицательные при подсчете чувствительности.

Чтобы оценить воспроизводимость в пределах одного теста, четыре образца (один отрицательный и три положительных) были протестированы в двух повторностях в двух сериях тестов в течение 20-дневного периода. Концентрация (ЕОП/мл) определялась для каждого положительного образца. Результаты для отрицательных образцов выражены в виде соотношений. Среднее значение концентраций и пропорции, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариативности (%CV) для каждого из четырех образцов представлены в таблице ниже:

Точность в пределах серии тестов (воспроизводимость)

N=80	Отрицательный образец	Слабо положительный образец	Положительный образец	Высоко положительный образец
	Соотношение (ОП обр. / ОП R4a)	Концентрация (ЕОП/мл)		
Среднее	0.10	1.44	3.10	4.22
SD	0.02	0.19	0.40	0.76
%CV	16.0%	13.4%	13.0%	18.0%

9.6 Линейность

Линейный динамический диапазон анализа Platelia™ CMV IgG был установлен в пределах от 0 до 40 ЕОП/мл на основе исследования разведений, выполненных на 5 положительных образцах.

10 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Диагноз инфицирования ЦМВ может быть поставлен только после изучения совместно клинических и биологических данных. Результат единичного исследования титрования антител к ЦМВ класса IgG не является достаточным основанием для установления диагноза о недавнем инфицировании цитомегаловирусом.

11 – КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все произведенные реагенты приготовлены в соответствии с нашей Системой Качества, начиная с получения сырья и заканчивая организацией серийного производства конечного продукта. Каждая партия подвергается оценке с позиций контроля качества и выпускается на рынок только после соответствия предустановленному критерию принятия. Все документы, касающиеся производства и управления каждой партией, хранятся в пределах компании Bio-Rad.

12 – БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

1. Alford C.A., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J. 1990. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. Rev. Infect. Dis. 12: S745-S753.
2. Demmler G.J. 1991. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev. Infect. Dis. 13: 315-329.
3. Fowler K.B., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J., Boll T.J., Alford C.A. 1990. The outcome of congenital and cytomegalovirus in relation to maternal antibody status. N. Engl. J. Med. 326: 663-667.

4. **Gaytant M.A., Rours I.G., Steegers E.A., Galama J.M., Semmekrot B.A.** 2003. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Europ. J. Pediatr.* **162**: 248-253.
5. **Grangeot-Keros L., Mayaux M.J., Lebon P., and al.** 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J. Infect. Dis.* **175**: 944-946.
6. **Lazzarotto T., Guerra B., Spezzacatena P., Varani S., Gabrielli L., Pradelli P., Rumpianesi F., Banzi C., Bovicelli L., Landini M.P.** 1998. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3540-3544.
7. **Macé M., Sissoef L., Rudent A., Grangeot-Keros L.** 2004. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat. Diagn.* **28**: 861-863.
8. **Munro S.C., Hall B., Whybin L.R., Leader L., Robertson P., Maine G.T., Rawlinson W.D.** 2005. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4713-4718.
9. **Revello M.L., Gerna G.** 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 680-715.
10. **Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., and al.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infections. *N. Engl. J. Med.* **306**: 945-949.

Platelia™ CMV IgM 72811
96 тестов

**Обнаружение антител класса IgM к цитомегаловирусу в
сыворотке крови или плазме человека
иммуноферментным методом**

1 – ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Platelia™ CMV IgM представляет собой иммунологический анализ, использующий метод захвата для качественного обнаружения антител класса IgM к цитомегаловирусу в сыворотке крови или плазме человека.

2 – КЛИНИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

Цитомегаловирус человека (ЦМВ) – распространенный вирус, который был обнаружен во всех географических районах мира у представителей всех социально-экономических групп. ЦМВ принадлежит к семейству вирусов герпеса и переносится через биологические жидкости при тесном межличностном контакте (через мочу, слюну, молоко матери, кровь, слезы, сперму и вагинальные секреты). После заражения ЦМВ может оставаться в организме зараженных пациентов в неактивном состоянии в течение нескольких лет, а затем повторно активироваться, вызывая рецидивирующую инфекцию и риск заражения других людей.

Первичная инфекция является результатом разных способов передачи и характерна для различных периодов жизни (врожденные инфекции, послеродовые инфекции). После фазы скрытой активности повторная инфекция может возникнуть вследствие нового заражения экзогенным вирусом или активации латентного вируса.

Заражение 50-80% населения происходит до достижения совершеннолетия, но в большинстве случаев инфекция протекает бессимптомно, причем только у 2% пациентов наблюдаются атипичные симптомы, такие как лихорадка, астения, боли в мышцах или суставах. Однако инфицирование ЦМВ может оказаться опасным для беременных женщин, новорожденных, а также для людей с ослабленным иммунитетом.

Во время беременности от 1 до 3% женщин получают заражение ЦМВ, а внутриутробная инфекция путем плацентарной диффузии наблюдается у 40-50% пациенток. 95% случаев внутриутробного инфицирования протекают бессимптомно, но оставшиеся 5% характеризуются серьезнейшими осложнениями: гепатоспленомегалией, микроцефалией, гидроцефалией, преждевременными родами, задержкой психомоторной активности и внутриутробной смертью плода. В 10% случаев бессимптомного протекания инфекции у новорожденных наблюдаются запоздалые осложнения, такие как частичная или полная глухота или слепота.

У пациентов с ослабленным иммунитетом (вследствие СПИДа, пересадки органов, лимфопролиферативных заболеваний или рака) с диссеминированной и/или висцеральной инфекцией связаны серьезные осложнения: спленомегалия, хориоретинит, гепатит, пневмония, миокардит, энцефалит. Для таких пациентов инфицирование может привести к летальному исходу.

Спустя несколько недель после заражения ЦМВ иммунная реакция приводит к появлению сначала особых антител класса IgM, а затем особых антител класса IgG. Серологическая диагностика инфекции ЦМВ проявляется в виде сероконверсии либо значительного увеличения титра IgG. Обнаружение специфических антител к ЦМВ класса IgM является полезным при диагностировании первичной и врожденной инфекции цитомегаловирусом.

3 – ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Platelia™ CMV IgM – это качественный тест, направленный на обнаружение антител класса IgM к цитомегаловирусу в сыворотке крови или плазме человека с использованием метода иммуноферментного анализа с захватом иммуноглобулинов класса М во время твердой фазы.

Антитела к μ -цепям человека сенсibiliзируются во время твердой фазы (в лунках микропланшета). В качестве конъюгата используется смесь антигена ЦМВ и меченного пероксидазой моноклонального антитела к антигенам ЦМВ. Тест состоит из следующих этапов:

- **Этап 1**

Образцы пациентов, калибратор и контрольные образцы разбавляются в соотношении 1/21 и затем распределяются по лункам микропланшета. Во время 1-часовой инкубации при температуре 37°C антитела класса IgM, находящиеся в образце, вступают в связь с антителами к μ -цепям на лунках микропланшета. По истечении инкубации иммуноглобулины класса G и остальные серопотеины удаляются во время промывки.

- **Этап 2**

Конъюгат (смесь антигена ЦМВ и меченного пероксидазой моноклонального антитела к ЦМВ) добавляется в лунки микропланшета. Во время 1-часовой инкубации при температуре 37°C меченое конъюгат вступает в связь со специфическими антителами к ЦМВ класса IgM, которые в конечном итоге были захвачены на микропланшете. Несвязанный конъюгат удаляется во время промывки в конце инкубации.

- **Этап 3**

Наличие иммунных комплексов (меченное пероксидазой моноклональное антитело к μ -цепям человека / класса IgM к ЦМВ / к антигену ЦМВ / к ЦМВ) демонстрируется добавлением в каждую лунку ферментного проявляющего раствора.

- **Этап 4**

После инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) ферментативная реакция прерывается добавлением однонормального раствора серной кислоты. Показатели оптической плотности, полученные при помощи спектрофотометра, настроенного на 450/620 нм, пропорциональны количеству антител к ЦМВ класса IgM, присутствующих в образце.

4 – ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

Реагенты предоставляются в количестве, достаточном для выполнения 96 анализов. Все реагенты предназначены для проведения диагностики исключительно в лабораторных условиях.

Маркировка		Тип реагента	Наличие
R1	Микропланшет	Микропланшет: (готов к	1

		использованию) – 12 стрипов с 8 отрывными лунками, сенсibilизированными инактивированным антигеном ЦМВ	
R2	Концентрированный промывочный раствор (20х)	Концентрированный промывочный раствор (20х): - Буферный раствор Tris-NaCl (pH 7.4) - 2%-ый раствор Tween® 20 - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 70 мл
R3	Отрицательный контрольный образец	Отрицательный контрольный образец: - Сыворотка крови человека, дающая отрицательный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM, а также на наличие антигена HBs*, anti-HIV1**, anti-HIV2 и anti-HCV*** - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R4	Калибратор	Калибратор: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM и отрицательный результат на наличие антигена HBs, anti-HIV1, anti-HIV2 и anti-HCV - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R5	Положительный контрольный образец	Положительный контрольный образец: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM и отрицательный результат на наличие антигена HBs, anti-HIV1, anti-HIV2 и anti-HCV - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R6a	Антиген	Антиген ЦМВ: - Лиофилизированный антиген ЦМВ - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	6 x qs 4.5 мл
R6b	Конъюгат	Конъюгат (101х): - Меченное пероксидазой мышинное моноклональное антитело к ЦМВ - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,4 мл
R7	Разбавитель	Раствор для разведения образцов и	1 x 80 мл

* HBs – гепатит В

** HIV - ВИЧ

*** HCV – вирус гепатита С

		конъюгата (готов к употреблению): - Буферный раствор Tris-NaCl (pH 7.7) - Фетальная телячья сыворотка - Козлиная сыворотка - Мышинные иммуноглобулины класса G - Краситель феноловый красный - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	
R9	Хромоген ТМБ	Хромоген (готов к употреблению) - 3,3',5,5'-тетраметилбензидиновый раствор (< 0.1%), - H ₂ O ₂ (<1.0%)	1 x 28 мл
R10	Стоп-раствор	Останавливающий раствор (готов к употреблению): - однонормальный раствор серной кислоты	1 x 28 мл
		Клейкая пленка	4

Условия хранения и дату истечения срока годности смотрите в указаниях на упаковке.

5 – ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Надежность результатов зависит от корректного применения следующих Правил работы в лаборатории:

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте и не применяйте совместно реагенты из упаковок с различными номерами партий в ходе одной серии тестов.

Примечание: Вы можете использовать промывочный раствор (R2, помечен зеленым цветом как 20x), хромоген (R9, помечен* бирюзовым цветом как ТМБ) и стоп-раствор (R10, помечен* красным цветом как 1N) из других партий, а не из исходной, при условии, что сами реагенты, используемые в одной серии тестов, принадлежат одной партии.*

Примечание: помимо этого, промывочный раствор (R2, помеченный зеленым цветом как 20x) можно смешать с 2 другими промывочными растворами из различных наборов реагентов Bio-Rad (R2, помеченным* синим цветом как 10x или оранжевым цветом как 10x) при условии правильного растворения и того, что в рамках одной серии тестов используется одна и та же смесь.*

- Перед использованием подождите 30 минут, чтобы реагенты достигли комнатной температуры (от +18 до +30°C).
- Аккуратно произведите растворение или разбавление реагентов, остерегаясь любого загрязнения.
- Не проводите тест при наличии реактивных паров (кислотных, щелочных, альдегидных) или пыли, которые могут повлиять на ферментную активность конъюгата.
- Используйте стеклянные контейнеры, которые прошли тщательную промывку и очистку дистиллированной водой, или, предпочтительнее, материалы одноразового применения.

* На пробирочной этикетке

- Промывка микропланшета – крайне важный этап процедуры: выполните рекомендованное число промывочных циклов и убедитесь, что все лунки сначала полностью заполнены, а затем полностью опорожнены. Некорректная промывка может привести к искажению результатов.
- Микропланшет не должен быть сухим в период между окончанием промывочного цикла и добавлением реагентов.
- Не используйте один и тот же флакон для конъюгата и проявляющего раствора.
- Ферментная реакция чрезвычайно чувствительна к любым металлам или ионам металлов. Следовательно, не допускается контакт металлических предметов с различными растворами, содержащими конъюгат или хромоген.
- Раствор хромогена (R9) должен быть бесцветным. Появление голубоватого оттенка указывает на то, что реагент непригоден для использования и должен быть заменен.
- При внесении каждого образца используйте новый дозирующий наконечник.
- Тщательно проверяйте наконечники и остальное оборудование для обеспечения корректного выполнения операций и повышения точности результатов.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ОХРАНЕ ТРУДА И ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Результаты тестирования показали, что исходный человеческий материал, использовавшийся при приготовлении реагентов, не реагирует с поверхностным антигеном гепатита В (HBs Ag), антителами к вирусу гепатита С (anti-HCV) и к вирусу иммунодефицита человека (anti-HIV1 и anti-HIV2). Поскольку ни один метод не может с абсолютной точностью гарантировать отсутствие возбудителей инфекции, обращайтесь с реагентами человеческого происхождения и образцами пациентов как с потенциальными носителями инфекционных заболеваний:

- Любые материалы, включая промывочные растворы, которые участвуют в прямом контакте с образцами и реагентами, содержащими элементы человеческого происхождения, следует рассматривать как возможные носители инфекционных заболеваний.
- При работе с образцами и реагентами всегда надевайте перчатки одноразового использования.
- Не производите пипеттирование при помощи рта.
- Избегайте разбрызгивания образцов или растворов. Проливы следует обработать дезинфицирующим средством (жавелевой водой), растворенным в воде в пропорции 1:10. В случае пролива кислоты сначала нужно ее нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем обработать дезинфицирующим средством (жавелевой водой), растворенным в воде в пропорции 1:10, и промокнуть фильтровальной бумагой. Материал, использовавшийся при очистке, должен быть утилизирован в специальном контейнере для контаминированных отходов.
- Образцы пациентов и реагенты, содержащие материалы человеческого происхождения, а также все зараженные материалы и продукты следует утилизировать только после проведения обеззараживания:
 - или помещением их в дезинфицирующий раствор (жавелевую воду) с конечной концентрацией жавелевой воды 5% на 30 минут,
 - или автоклавированием при температуре 121°C не менее 2 часов.

ВНИМАНИЕ: не помещайте в автоклав растворы, содержащие жавелевую воду.

- Избегайте контакта реагентов, включая признанные безопасными, с кожей и слизистыми оболочками.

- Работа с химическими и биологическими отходами, а также их утилизация должны проводиться согласно Правилам работы в лаборатории.
- Все реагенты в наборе предназначены для диагностирования исключительно в лабораторных условиях.



Осторожно: некоторые реагенты содержат < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300:

R43: Может вызвать аллергическую реакцию при попадании на кожу.

S28-37: После контакта с кожей немедленно промойте соответствующий участок большим количеством воды и мыла. Работайте в перчатках.

Раздражающее вещество

6 – ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка крови и плазма (ЭДТК, гепарин или цитрат) являются рекомендуемыми типами образцов.
2. Ознакомьтесь с нижеследующими указаниями к обработке и хранению образцов крови:
 - Выполните забор всех образцов крови, соблюдая меры предосторожности при проведении венопункции.
 - В случае сыворотки крови дайте образцам полностью свернуться перед центрифугированием.
 - Пробирки должны быть все время запечатаны.
 - После центрифугирования отделите сыворотку или плазму от сгустков или скоплений эритроцитов и поместите ее в плотно закрытую пробирку на хранение.
 - Образцы можно хранить при температуре +2-8°C, если тест будет проведен в течение 7 дней.
 - В случае, если тест не будет проводиться в течение ближайших 7 дней, либо для перевозки заморозьте образцы при температуре -20°C или ниже.
 - Не используйте образцы, которые проходили размораживание более 5 раз. После размораживания образцы следует тщательно встряхнуть перед тестированием.
3. На результаты не влияет содержание в образцах альбумина в количестве 90 г/л или свободного билирубина (100 мг/л), липемических образцах – триолеина (триглицерида) в количестве 36 г/л, гемолизированных образцах – гемоглобина (10 г/л).
4. Не нагревайте образцы.

7 – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

7.1 Требуемое, но не входящее в набор оборудование

- «Вихревой» смеситель.
- Считывающее устройство для микропланшетов, оборудованное фильтрами по 420 и 620 нм (*).
- Инкубатор для микропланшетов, настроенный на температуру 37±1°C (*).

(*) Обращайтесь в наш Технический отдел за дополнительной информацией о рекомендованном оборудовании.

- Автоматическое, полуавтоматическое или ручное промывочное устройство для микропланшетов (*).
- Стерильная дистиллированная или деминерализованная вода.
- Одноразовые перчатки.
- Фильтровальная бумага.
- Пипетки или многоканальные пипетки (автоматические или полуавтоматические, регулируемые или нерегулируемые), которые могут отмерять и дозировать объемы от 10 до 1000 мкл, а также 1 мл, 2 мл и 10 мл.
- Градуированные цилиндры емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1000 мл.
- Гипохлорит натрия (жавелевая вода) и бикарбонат натрия.
- Емкость для контаминированных отходов.
- Одноразовые пробирки.

7.2 Приготовление (растворение) реагентов

- **R1:** Перед тем, как открывать пакет, подержите его в течение 30 минут при комнатной температуре (+18-30°C). Извлеките лоток механизма для транспортировки планшетов, затем незамедлительно поместите неиспользованные стрипы обратно в пакет и проверьте наличие влагопоглотителя. Тщательно закройте пакет и верните на место хранения (при температуре 2-8°C).
- **R2:** Разведите промывочный раствор R2 в дистиллированной воде в соотношении 1/20 (например, 50 мл R2 и 950 мл дистиллированной воды) для получения готового к применению промывочного раствора. Приготовьте 350 мл разведенного промывочного раствора на один планшет из 12 стрипов при ручной промывке.
- **R3, R4, R5:** Разведите в разбавителе (R7) в пропорции 1/21 (например, 300 мкл разбавителя R7 и 15 мкл калибратора или контрольного образца).
- **R6a:** Антиген ЦМВ лиофилизирован. Для обработки 2 стрипов разведите одну пробирку лиофилизированного антигена, добавив 4,5 мл разбавителя (R7). Тщательно перемешайте. После разведения антигенный раствор (R6a+R7) должен стать абсолютно прозрачным.
- **R6 (R6a+R6b):** Рабочий раствор конъюгата: добавьте 45 мкл конъюгата (R6b) в каждую пробирку с растворенным антигеном ЦМВ (R6a+R7). Тщательно перемешайте. Рабочий раствор конъюгата следует использовать сразу после растворения.

7.3. Хранение и пригодность открытых и/или растворенных реагентов

Набор следует хранить при температуре +2-8°C. Если набор держать при данной температуре до открытия, то каждый его компонент можно использовать до даты истечения срока годности, указанной на наружной этикетке набора.

- **R1:** После открытия стрипы сохраняют устойчивое состояние в течение 8 недель при условии хранения в температурном режиме +2-8°C в том же плотно закрытом пакете (проверьте наличие влагопоглотителя).
- **R2:** После разведения промывочный раствор можно хранить в течение 2 недель при температуре +2-30°C. После открытия концентрированный промывочный

(*) Обращайтесь в наш Технический отдел за дополнительной информацией о рекомендованном оборудовании.

раствор, хранившийся при температуре +2-30°C, в отсутствие заражения остается устойчивым до даты истечения срока годности, указанной на этикетке.

- **R3, R4, R5, R6b, R7:** После открытия в отсутствие заражения реагенты, хранящиеся при температуре +2-8°C, остаются устойчивыми до 8 недель.
- **R6 (R6a+R6b):** После растворения рабочий раствор конъюгата следует использовать незамедлительно.
- **R9:** После открытия в отсутствие заражения реагент будет сохранять устойчивость до 8 недель при его хранении в температурном режиме +2-8°C.
- **R10:** После открытия в отсутствие заражения реагент будет сохранять устойчивость до даты истечения срока годности, указанной на этикетке, при его хранении в температурном режиме +2-8°C.

7.4 Процедура

Строго соблюдайте установленный порядок проведения анализа и Правила работы в лаборатории.

Перед началом работы дайте реагентам достичь комнатной температуры (18-30°C).

Использование отрывных лунок требует особого внимания.

В ходе каждой серии тестов используйте калибратор и контрольные образцы для подтверждения результатов исследования.

1. Тщательно продумайте план распределения и идентификации калибраторов и образцов пациентов.
2. Приготовьте разбавленный промывочный раствор (R2) [Смотрите Раздел 7.2].
3. Извлеките раму и стрипы (R1) из защитной упаковки [Смотрите Раздел 7.2].
4. В специально обозначенных пробирках разведите калибратор (R4) и контрольные образцы (R3, R5), а также образцы пациентов (S1, S2...) в разбавителе (R7) в пропорции 1/21: 300 мкл разбавителя (R7) и 15 мкл образца. Перемешайте образцы в вихревом смесителе.
5. Строго следуя приведенной ниже последовательности действий, внесите в каждую лунку 200 мкл разведенных калибратора, контрольных образцов и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5	S13									
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

6. Накройте микропланшет клейкой пленкой, прижимая ее ко всей поверхности для обеспечения герметичности. Сразу после этого произведите инкубацию микропланшета в термостатически регулируемой водяной бане или в сухом инкубаторе в течение часа ± 5 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
7. Приготовьте рабочий раствор конъюгата R6 (R6a+R6b) [Смотрите Раздел 7.2].
8. В конце первого инкубационного периода снимите клейкую пленку. Выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов

- контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду). Промойте микропланшет 4 раза с использованием 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
9. Сразу после этого внесите 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6) в каждую лунку. Перед использованием раствор следует аккуратно взболтать.
 10. Накройте микропланшет клейкой пленкой, прижимая ее ко всей поверхности для обеспечения герметичности. Сразу после этого произведите инкубацию микропланшета в термостатически регулируемой водяной бане или в сухом инкубаторе в течение часа ± 5 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 11. В конце второго инкубационного периода снимите клейкую пленку. Выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду). Промойте микропланшет 4 раза с использованием 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
 12. **Вдали от яркого света** быстро внесите 200 мкл раствора хромогена (R9) в каждую лунку. **Выполните инкубацию микропланшета в темноте при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$) в течение 30 ± 5 минут.** Не используйте клейкую пленку во время этой стадии инкубации.
 13. Прекратите ферментативную реакцию, добавив 100 мкл стоп-раствора (R10) в каждую лунку. Внесение выполните в той же последовательности и в том же ритме, что и для раствора субстрата.
 14. Тщательно протрите дно микропланшета. С помощью сканера микропланшетов считайте значение оптической плотности каждой лунки при длине волны 450/620 нм в течение 30 минут с момента прекращения реакции. Стрипы всегда следует держать вдали от прямого света перед процедурой считывания.
 15. Проверьте соответствие между выходными данными считывающего устройства и графиком внесения растворов на микропланшет перед расшифровкой результатов.

8 – ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Вычисление **граничных/отсекаемых значений (CO)**

Граничное значение (CO) соответствует среднему значению оптических плотностей (ОП) экземпляров граничного контрольного образца (R4):

$$\text{CO} = \text{mean of OD R4}$$

8.2 Вычисление **отношения образцов (Sample Ratio)**

Результат, полученный для каждого образца, выражается в виде пропорции по следующей формуле:

$$\text{Sample Ratio} = \text{ОП образца} / \text{CO}$$

8.3 Контроль качества

Используйте калибратор и контрольные образцы на каждом микропланшете всякий раз при проведении теста и с их помощью анализируйте полученные результаты. Для подтверждения анализа должны быть удовлетворены следующие критерии:

- **Значения оптической плотности**
 $CO > 0.200$
 $0.80 \times CO < ОП R4 Э_{кз.1} < 1.20 \times CO$
 $0.80 \times CO < ОП R4 Э_{кз.2} < 1.20 \times CO$

(Значения оптической плотности каждого экземпляра граничного контрольного образца (R4) не должны отличаться от значения CO более чем на 20%.)

- **Соотношение оптических плотностей**
 Отношение R3 ($ОП R3 / CO$) < 0.50
 Отношение R5 ($ОП R5 / CO$) > 1.60

Если данные критерии не выполнены, следует провести ещё одну серию тестов.

8.4 Интерпретация результатов

Отношение образцов	Результат	Интерпретация
Отношение < 0.90	Отрицательный	Образец признается дающим отрицательный результат на наличие антител класса IgM к ЦМВ.
$0.90 \leq \text{Отношение} < 1.10$	Сомнительный	Образец признается дающим промежуточный результат на наличие антител класса IgM к ЦМВ. Результат следует подтвердить повторным тестированием пациента минимум 3 недели спустя с момента первоначального исследования.
Отношение ≥ 1.10	Положительный	Образец признается дающим положительный результат на наличие антител класса IgM к ЦМВ.

Если возникло подозрение на недавнее инфицирование, то для подтверждения диагноза могут пригодиться другие серологические тесты, например, измеряющие авидитет антител класса IgG.

8.4 Руководство по поиску и устранению неисправностей

Неподтвержденные или неповторяющиеся реакции, как правило, вызваны:

- Некорректной промывкой микропланшетов
- Контаминированием отрицательных образцов сывороткой крови или плазмой с высоким титром антител.
- Контаминированием раствора субстрата химическими окислителями (дезинфектантами, ионами металлов...).
- Контаминированием стоп-раствора.

9 – ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Эксплуатационные характеристики анализа Platelia™ CMV IgM оценивались на основе исследования 824 образцов, взятых у беременных женщин и доноров, проведенного в 2 лабораториях.

9.1 Распространенность

Распространенность антител к ЦМВ класса IgM при использовании анализа Platelia™ CMV IgM была оценена на основе 300 образцов, взятых у беременных женщин, проживающих в районе Парижа (Франция). 5 образцов дали положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM. Распространенность, полученная по результатам анализа Platelia™ CMV IgM, признана равной 1.7% (5/300).

9.2 Специфичность

Относительная специфичность была оценена в 2 лабораториях, расположенных во Франции, на основе 740 образцов, из которых

- 252 содержали сыворотку крови доноров
- 488 – сыворотку крови беременных женщин

Результаты прошли сравнение с результатами, полученными при использовании коммерческого ИФА-теста* в качестве эталона.

Группа тестируемых пациентов / клиника		Количество образцов сыворотки крови	Отрицательные	Сомнительные	Положительные	Специфичность
Клиника 1	Беременные женщины	205	203	1	1	99.0% [96.5 – 99.9] (203/205)
	Доноры	252	249	2	1	98.8% [96.6 – 99.7] (249/252)
Клиника 2	Беременные женщины	283	282	0	1	99.7% [98.1 – 100.0] (282/283)
Всего		740	734	3	3	99.2% [98.2 – 99.7] (734/740)

Сомнительные образцы рассматривались как положительные при вычислении специфичности.

[ДИ 95%] = 95%-ый доверительный интервал.

9.3 Чувствительность

Относительная чувствительность была оценена на основе 113 образцов в 2 лабораториях, расположенных во Франции, из них:

- 35 образцов, взятых у 16 различных пациентов, показывающих динамику первичной инфекции ЦМВ (лаборатория 2)
- 49 образцов из 3 коммерческих наборов с сероконверсией (лаборатория 1)
- 29 отдельных образцов, дающих положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM (лаборатория 1)

Результаты прошли сравнение с результатами, полученными при использовании коммерческого ИФА-теста* в качестве эталона.

* ИФА – иммуноферментный анализ

* ИФА – иммуноферментный анализ

Из 35 образцов с первичным инфицированием ЦМВ антитела класса IgM были обнаружены различными методами в 29 образцах. Во всех этих 29 образцах присутствовали антитела к ЦМВ класса IgG с низким авидитетом. 2 образца дали положительный результат на наличие антител класса IgM к ЦМВ при использовании эталонного теста, но не Platelia™ CMV IgM. Эти 2 образца содержали антитела к ЦМВ класса IgG со средним авидитетом и соответствовали образцам, взятым практически сразу после начала инфекции.

Результаты, полученные для 3 наборов образцов с сероконверсией, выглядят следующим образом:

- В первом наборе анализом Platelia™ CMV IgM были обнаружены антитела к ЦМВ класса IgM на 10 дней раньше, чем при использовании эталонного теста.
- В случае второго набора обнаружение антител к ЦМВ класса IgM произошло одновременно (при этом эталонный тест показал сомнительные результаты, а Platelia™ CMV IgM – положительные).
- В третьем наборе анализом Platelia™ CMV IgM были обнаружены антитела к ЦМВ класса IgM на 3 дней позже, чем при использовании эталонного теста (при этом эталонный тест показал сомнительные результаты, а Platelia™ CMV IgM – отрицательные).

Наконец, 28 из 29 отдельных образцов были признаны положительными анализом Platelia™ CMV IgM, оставшийся образец – сомнительным.

9.4. Перекрестная реактивность

На наличие антител к ЦМВ класса IgM был протестирован набор из 156 образцов, включая 115 образцов, показавших положительный результат на наличие токсоплазмоза, краснухи, вируса Эпштейна-Барра, вируса простого герпеса, вируса ветряной оспы, свинки и ВИЧ, и 41 образец, показавший положительный результат на наличие ревматоидного фактора, аутоиммунных антител и гетерофильных антител, взятый в том числе у больных миеломой. При тестировании помимо анализа Platelia™ CMV IgG использовался коммерческий ИФА-тест* в качестве эталона.

Среди перечисленных образцов только 2 дали положительный результат при тестировании анализом Platelia™ CMV IgM: 1 образец сыворотки крови, положительный на наличие антител к вирусам краснухи класса IgG, показавший отрицательный результат при использовании эталонного теста, и 1 образец сыворотки крови, положительный на наличие ревматоидного фактора, показавший аналогичный результат при использовании эталонного теста.

9.5. Точность

- Точность в пределах серии тестов (повторяемость):

Чтобы оценить повторяемость результатов в пределах анализа, для данной серии были протестированы 30 раз один отрицательный и три положительных образца. Для каждого образца было определено отношение (ОП образца / СО). Среднее значение отношений, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариативности (%CV) для каждого из 4 образцов приведены в следующей таблице:

* ИФА – иммуно-ферментный анализ

N=30	Отрицательный образец	Слабо положительный образец	Положительный образец	Высоко положительный образец
Отношение (ОП обр. / граничное значение)				
Среднее	0.11	1.13	1.90	3.75
SD	0.01	0.07	0.09	0.09
%CV	11.4%	6.2%	4.8%	2.3%

- Точность в пределах серии тестов (воспроизводимость):

Чтобы оценить воспроизводимость в пределах одного теста, четыре образца (один отрицательный и три положительных) были протестированы в двух экземплярах в двух сериях тестов в течение 20-дневного периода. Для каждого образца было определено отношение (ОП образца / СО). Среднее значение отношений, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариативности (%CV) для каждого из 4 образцов приведены в следующей таблице:

Точность в пределах серии тестов (воспроизводимость)

N=80	Отрицательный образец	Слабо положительный образец	Положительный образец	Высоко положительный образец
Отношение (ОП обр. / граничное значение)				
Среднее	0.18	1.06	1.76	3.28
SD	0.041	0.11	0.18	0.30
%CV	22.5%	9.9%	10.3%	9.1%

10 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Диагноз инфицирования ЦМВ может быть поставлен только после изучения совместно клинических и биологических данных. Результат единичного исследования титрования антител к ЦМВ класса IgG не является достаточным основанием для установления диагноза о недавнем инфицировании цитомегаловирусом.

- Диагностика недавнего инфицирования может быть проведена только при наличии полной информации о пациенте, включая клинические и биологические данные (резкое увеличение антител к ЦМВ класса IgG в 2 образцах сыворотки крови пациента, взятых с 3-недельной разницей и исследовавшихся в ходе одной серии тестов, наличие антител к ЦМВ класса IgM на значимом уровне, низкий авидитет иммуноглобулинов класса G).
- Наличие антител к ЦМВ класса IgM не является достаточным основанием для установления диагноза о недавнем инфицировании, поскольку иммуноглобулины класса М могут сохраняться в течение нескольких месяцев или даже лет с момента заражения. При обнаружении иммуноглобулинов класса М следует провести количественное определение антител к ЦМВ класса IgG, а также последующее наблюдение за развитием антител к ЦМВ, протестировав по крайней мере ещё один образец сыворотки крови, взятый три недели спустя.
- Если тестирование образца было проведено слишком рано во время недавнего первичного заражения, антитела к ЦМВ класса IgM могут вообще не присутствовать. Если подозрение на инфекцию сохраняется, рекомендуется

выполнить повторный забор образца через 3 недели и провести новое тестирование на наличие IgM.

11 – КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все произведенные реагенты приготовлены в соответствии с нашей Системой Качества, начиная с получения сырья и заканчивая организацией серийного производства конечного продукта. Каждая партия подвергается оценке с позиций контроля качества и выпускается на рынок только после соответствия предустановленному критерию принятия. Все документы, касающиеся производства и управления каждой партией, хранятся в пределах компании Bio-Rad.

12 – БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

1. **Alford C.A., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J.** 1990. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* **12**: S745-S753.
2. **Demmler G.J.** 1991. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 315-329.
3. **Fowler K.B., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J., Boll T.J., Alford C.A.** 1990. The outcome of congenital and cytomegalovirus in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* **326**: 663-667.
4. **Gaytant M.A., Rours I.G., Steegers E.A., Galama J.M., Semmekrot B.A.** 2003. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Europ. J. Pediatr.* **162**: 248-253.
5. **Grangeot-Keros L., Mayaux M.J., Lebon P., and al.** 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J. Infect. Dis.* **175**: 944-946.
6. **Lazzarotto T., Guerra B., Spezzacatena P., Varani S., Gabrielli L., Pradelli P., Rumpianesi F., Banzi C., Bovicelli L., Landini M.P.** 1998. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3540-3544.
7. **Macé M., Sissoef L., Rudent A., Grangeot-Keros L.** 2004. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat. Diagn.* **28**: 861-863.
8. **Munro S.C., Hall B., Whybin L.R., Leader L., Robertson P., Maine G.T., Rawlinson W.D.** 2005. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4713-4718.
9. **Revello M.L., Gerna G.** 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 680-715.
10. **Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., and al.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infections. *N. Engl. J. Med.* **306**: 945-949.

Platelia™ CMV IgG AVIDITY 72812

48 тестов

**Определение авидитета антител класса IgG к
цитомегаловирусу иммуноферментным методом**

1 – ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Platelia™ CMV IgG AVIDITY представляет собой иммуноферментный анализ, предназначенный для определения авидитета антител класса IgG к цитомегаловирусу в сыворотке крови человека. Анализ Platelia™ CMV IgG AVIDITY следует использовать совместно с набором Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

2 – КЛИНИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

Цитомегаловирус человека (ЦМВ) – распространенный вирус, который был обнаружен во всех географических районах мира у представителей всех социально-экономических групп. ЦМВ принадлежит к семейству вирусов герпеса и передается через биологические жидкости при тесном межличностном контакте (через мочу, слюну, молоко матери, кровь, слезы, сперму и вагинальные секреты). После заражения ЦМВ может оставаться в организме зараженных пациентов в неактивном состоянии в течение нескольких лет, а затем повторно активироваться, вызывая рецидивирующую инфекцию и риск заражения других людей.

Первичная инфекция является результатом разных способов передачи и характерна для различных периодов жизни (врожденные инфекции, послеродовые инфекции). После фазы скрытой активности повторная инфекция может возникнуть вследствие нового заражения экзогенным вирусом или активации латентного вируса.

Заражение 50-80% населения происходит до достижения совершеннолетия, но в большинстве случаев инфекция протекает бессимптомно, причем только у 2% пациентов наблюдаются атипичные симптомы, такие как лихорадка, астения, боли в мышцах или суставах. Однако инфицирование ЦМВ может оказаться опасным для беременных женщин, новорожденных, а также для людей с ослабленным иммунитетом.

Во время беременности от 1 до 3% женщин получают заражение ЦМВ, а внутриутробная инфекция путем плацентарной диффузии наблюдается у 40-50% пациенток. 95% случаев внутриутробного инфицирования протекают бессимптомно, но оставшиеся 5% характеризуются серьезнейшими осложнениями: гепатоспленомегалией, микроцефалией, гидроцефалией, преждевременными родами, задержкой психомоторной активности и внутриутробной смертью плода. В 10% случаев бессимптомного протекания инфекции у новорожденных наблюдаются запоздалые осложнения, такие как частичная или полная глухота или слепота.

У пациентов с ослабленным иммунитетом (вследствие СПИДа, пересадки органов, лимфопролиферативных заболеваний или рака) с диссеминированной и/или висцеральной инфекцией связаны серьезные осложнения: спленомегалия, хориоретинит, гепатит, пневмония, миокардит, энцефалит. Для таких пациентов инфицирование может привести к летальному исходу.

Спустя несколько недель после заражения ЦМВ иммунная реакция приводит к появлению сначала особых антител класса IgM, а затем особых антител класса IgG. Серологическая диагностика инфекции ЦМВ проявляется в виде сероконверсии либо значительного увеличения титра IgG. Обнаружение специфических антител к

ЦМВ класса IgM является полезным при диагностировании первичной и врожденной инфекции цитомегаловирусом.

Однако различительный анализ недавней и прошлой инфекции бывает затруднителен в связи с длительным существованием антител к ЦМВ класса IgM или их новым появлением в случае повторной инфекции, а также реактивацией латентной инфекции или неспецифичным раздражением иммунной системы. В таких ситуациях измерение авидитета антител класса IgG иммуноферментным методом может помочь различить острую и прошлую инфекцию. Такое определение основывается на эволюции созревания иммунной реакции, которая преобразуется в синтез антител класса IgG с низким авидитетом во время первичных инфекций и с высоким авидитетом во время прошлых инфекций.

3 – ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Настоящий тест проводится при использовании анализа Platelia™ CMV IgG AVIDITY (Ref. 72812) совместно с Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

Принцип данного метода основывается на измерении авидитета антител к ЦМВ класса IgG. Использование агента (например, мочевины), разрывающего связь антиген/антитело одновременно со стандартной техникой измерения антител класса IgG позволяет сравнивать оптическую плотность (ОП), полученную после воздействия диссоциирующим агентом, и ОП, полученную без воздействия этим агентом.

Авидитет считается низким, если связь антиген/антитело легко разрывается. Авидитет считается высоким, если связь антиген/антитело трудно разорвать.

Данный тест следует использовать только для положительных образцов с концентрацией антител к ЦМВ класса IgG выше, чем 0,5 ЕОП/мл, полученной при помощи анализа Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

• Этап 1

Авидитетные контрольные образцы и образцы сыворотки крови пациентов с концентрацией антител к ЦМВ класса IgG между 0,5 и 1,5 ЕОП/мл разбавляются в пропорции 1/21. Образцы сыворотки крови пациентов с концентрацией антител к ЦМВ класса IgG, равной или превышающей 1,5 ЕОП/мл, разбавляются в пропорции 1/101. Разбавленные образцы затем дважды вносятся в лунки микропланшета, сенсibilизированные антигеном ЦМВ. Во время 1-часовой инкубации при температуре 37°C антитела класса IgG к ЦМВ, находящиеся в образце, вступают в связь с антигеном ЦМВ на лунках микропланшета. По истечении инкубации несвязанные неспецифичные антитела и остальные серопроотеины удаляются во время промывки.

• Этап 2

Каждый авидитетный контрольный образец и каждый образец сыворотки крови пациента обрабатываются попарно: контрольный раствор добавляют в одну лунку, а диссоциирующий раствор – в другую. Во время 15-минутной инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) диссоциирующий раствор пытается разорвать совокупность антиген/антитело. По завершении инкубации оба раствора и диссоциированные IgG удаляются во время промывки.

• Этап 3

Конъюгат (меченное пероксидазой поликлональное антитело, характерное для гамма-цепей человека) добавляется в лунки микропланшета. Во время 1-часовой инкубации при температуре 37°C меченое антитело вступает в связь с

сывороточным иммуноглобулином класса G, захваченным антигеном ЦМВ. Несвязанный конъюгат удаляется во время промывки в конце инкубации.

• **Этап 4**

Наличие иммунных комплексов (антиген ЦМВ, антитела к ЦМВ класса IgG, конъюгат анти-IgG) демонстрируется добавлением в каждую лунку ферментного проявляющего раствора.

• **Этап 5**

После инкубации при комнатной температуре (+18-30°C) в течение 30 минут ферментативная реакция прерывается добавлением однонормального раствора серной кислоты. Показатели оптической плотности, полученные при помощи спектрофотометра, настроенного на 450/620 нм, пропорциональны количеству антител к ЦМВ класса IgM, присутствующих в образце.

4 – ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

Реагенты предоставляются в количестве, достаточном для выполнения 48 анализов совместно с набором Platelia™ CMV IgG kit (Ref. 72810). Все реагенты предназначены для проведения диагностики исключительно в лабораторных условиях.

Маркировка		Тип реагента	Наличие
R5a	Контрольный образец с низким авидитетом	Контрольный образец с низким авидитетом: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG, а также на наличие антигена HBs*, anti-HIV1**, anti-HIV2 и anti-HCV*** - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R5b	Контрольный образец с высоким авидитетом	Контрольный образец с высоким авидитетом: - Сыворотка крови человека, дающая положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM и отрицательный результат на наличие антигена HBs*, anti-HIV1**, anti-HIV2 и anti-HCV*** - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 0,75 мл
R12	Контрольный раствор	Контрольный раствор: - Буферный раствор Tris-NaCl (pH 7.6 ± 0.2) - 0.1%-ый раствор Tween® 20	1 x 28 мл

* HBs – гепатит В

** HIV - ВИЧ

*** HCV – вирус гепатита С

		- Зеленый краситель - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	
R13	Диссоциирующий раствор	Диссоциирующий раствор: - Буферный раствор Tris-NaCl (pH 7.6 ± 0.2) - Мочевина - 0.1%-ый раствор Tween® 20 - Желтый краситель - Консервант: < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300	1 x 13 мл

Условия хранения и дату истечения срока годности смотрите в указаниях на упаковке.

5 – ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Надежность результатов зависит от корректного применения следующих Правил работы в лаборатории:

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте и не применяйте совместно реагенты из упаковок с различными номерами партий в ходе одной серии тестов.
- Перед использованием подождите 30 минут, чтобы реагенты достигли комнатной температуры (от +18 до +30°C).
- Используйте стеклянные контейнеры, которые прошли тщательную промывку и очистку дистиллированной водой, или, предпочтительнее, материалы одноразового применения.
- При внесении каждого образца используйте новый дозирующий наконечник.
- Тщательно проверяйте наконечники и остальное оборудование для обеспечения корректного выполнения операций и повышения точности результатов.
- Строго следуйте процедуре анализа.
- Обратитесь также к информации на вкладыше к анализу Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

Примечание: Набор Platelia™ CMV IgG AVIDITY можно использовать с различными партиями набора Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

ИНСТРУКЦИЯ ПО ОХРАНЕ ТРУДА И ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Результаты тестирования показали, что исходный человеческий материал, использовавшийся при приготовлении реагентов, не реагирует с поверхностным антигеном гепатита В (HBs Ag), антителами к вирусу гепатита С (anti-HCV) и к вирусу иммунодефицита человека (anti-HIV1 и anti-HIV2). Поскольку ни один метод не может с абсолютной точностью гарантировать отсутствие возбудителей инфекции, обращайтесь с реагентами человеческого происхождения и образцами пациентов как с потенциальными носителями инфекционных заболеваний:

- Любые материалы, включая промывочные растворы, которые участвуют в прямом контакте с образцами и реагентами, содержащими элементы человеческого происхождения, следует рассматривать как возможные носители инфекционных заболеваний.
- При работе с образцами и реагентами всегда надевайте перчатки одноразового использования.

- Не производите пипеттирование при помощи рта.
- Избегайте разбрызгивания образцов или растворов. Проливы следует обработать дезинфицирующим средством (жавелевой водой), растворенным в воде в пропорции 1:10. В случае пролива кислоты сначала нужно ее нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем обработать дезинфицирующим средством (жавелевой водой), растворенным в воде в пропорции 1:10, и промокнуть фильтровальной бумагой. Материал, использовавшийся при очистке, должен быть утилизирован в специальном контейнере для контаминированных отходов.
- Образцы пациентов и реагенты, содержащие материалы человеческого происхождения, а также все зараженные материалы и продукты следует утилизировать только после проведения обеззараживания:
- Работа с химическими и биологическими отходами, а также их утилизация должны проводиться согласно Правилам работы в лаборатории.
- Все реагенты в наборе предназначены для диагностирования исключительно в лабораторных условиях.
- Обратитесь также к информации на вкладыше к анализу Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).



Осторожно: некоторые реагенты содержат < 1.5%-ый раствор ProClin™ 300:

R43: Может вызвать аллергическую реакцию при попадании на кожу.

S28-37: После контакта с кожей немедленно промойте соответствующий участок большим количеством воды и мыла. Работайте в перчатках.

Раздражающее вещество

6 – ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка крови является единственным рекомендуемым типом образца.
2. Ознакомьтесь с нижеследующими указаниями к обработке и хранению образцов крови:
 - Выполните забор всех образцов крови, соблюдая меры предосторожности при проведении венопункции.
 - Дайте образцам полностью свернуться перед центрифугированием.
 - Пробирки должны быть все время запечатаны.
 - После центрифугирования отделите сыворотку от сгустков или скоплений эритроцитов и поместите ее в плотно закрытую пробирку на хранение.
 - Образцы можно хранить при температуре +2-8°C, если тест будет проведен в течение 7 дней.
 - В случае, если тест не будет проводиться в течение ближайших 7 дней, либо для перевозки заморозьте образцы при температуре -20°C или ниже.
 - Не используйте образцы, которые проходили размораживание более 5 раз. После размораживания образцы следует тщательно встряхнуть (в вихревом смесителе) перед тестированием.
3. На результаты не влияет содержание в образцах альбумина в количестве 90 г/л или свободного билирубина (100 мг/л), липемических образцах – триолеина (триглицерида) в количестве 36 г/л, гемолизированных образцах – гемоглобина (10 г/л).
4. Не нагревайте образцы.

7 – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

7.1 Требуемое, но не входящее в набор оборудование

Обратитесь за информацией к вкладышу в наборе анализа Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

7.2 Приготовление (растворение) реагентов

- **R5a, R5b:** Контрольный образец с низким авидитетом (R5a) и контрольный образец с высоким авидитетом (R5b) следует разводить в пропорции 1/21 при использовании разбавителя (R7), поставляемого в наборе анализа Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).
- **R12, R13:** Контрольный раствор (R12) и диссоциирующий раствор (R13) готовы к употреблению.
- Для получения информации о других реагентах обратитесь к вкладышу в наборе анализа Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

7.3. Хранение и пригодность открытых и/или растворенных реагентов

Набор следует хранить при температуре +2-8°C. Если набор держать при данной температуре до открытия, то каждый его компонент можно использовать до даты истечения срока годности, указанной на наружной этикетке набора.

- **R5a, R5b:** После открытия в отсутствие заражения реагенты будут сохранять устойчивость до 8 недель при хранении в температурном режиме +2-8°C.
- **R12, R13:** После открытия в отсутствие заражения реагенты будут сохранять устойчивость до 8 недель при хранении в температурном режиме +2-8°C.

Обратитесь также к информации на вкладыше к анализу Platelia™ CMV IgG (Ref. 72810).

7.4 Процедура

Строго соблюдайте установленный порядок проведения анализа и Правила работы в лаборатории.

В ходе каждой серии тестов используйте контрольные образцы с низким авидитетом (R5a) и высоким авидитетом (R5b) для подтверждения результатов исследования.

Остальные используемые реагенты (R1, R2, R6, R7, R9 и R10) включены в набор Platelia™ CMV IgG kit (Ref. 72810).

Примечание: *перед использованием дайте реагентам (особенно R12 и R13) достигнуть комнатной температуры (от +18 до +30°C).*

1. Тщательно продумайте план распределения и идентификации калибраторов и образцов пациентов.
2. Приготовьте разбавленный промывочный раствор (R2).
3. Извлеките раму и стрипы (R1) из защитной упаковки.
4. В специально обозначенных пробирках разведите в разбавителе (R7) в пропорции 1/21 авидитетные контрольные образцы (R5a, R5b), а также образцы пациентов (S1, S2...) с концентрацией антител к ЦМВ класса IgG от 0,5 до 1,5 ЕОП/мл: [25 мкл образца и 0.5 мл разбавителя (R7)]. Перемешайте образцы в вихревом смесителе.

5. Строго следуя приведенной ниже последовательности действий, внесите в каждую лунку 200 мкл разведенных контрольных образцов и образцов пациентов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R5a	R5a	S7	S7								
B	R5b	R5b										
C	S1	S1										
D	S2	S2										
E	S3	S3										
F	S4	S4										
G	S5	S5										
H	S6	S6										

- Накройте микропланшет клейкой пленкой, прижимая ее ко всей поверхности для обеспечения герметичности. Сразу после этого произведите инкубацию микропланшета в термостатически регулируемой водяной бане или в сухом инкубаторе в течение часа ± 5 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- В конце первого инкубационного периода снимите клейкую пленку. Выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду).
- Быстро внесите 200 мкл контрольного раствора (R12) в каждую лунку стрипов с нечетным номером. После этого так же быстро внесите 200 мкл диссоциирующего раствора (R13) в каждую лунку стрипов с четным номером.
- Выполните инкубацию микропланшета в течение 15 ± 2 минут при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$).
- Перед окончанием инкубационного периода приготовьте рабочий раствор конъюгата (R6+R7).
- В конце инкубационного периода выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду). Промойте микропланшет 2 раза с использованием 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
- После этого незамедлительно внесите 200 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) в каждую лунку. Перед использованием раствор следует аккуратно взболтать.
- Накройте микропланшет клейкой пленкой, прижимая ее ко всей поверхности для обеспечения герметичности. Сразу после этого произведите инкубацию микропланшета в термостатически регулируемой водяной бане или в сухом инкубаторе в течение часа ± 5 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- В конце инкубационного периода снимите клейкую пленку. Выполните забор содержимого каждой лунки и поместите его в емкость для продуктов контаминированных отходов (содержащую гипохлорит натрия/жавелевую воду). Промойте микропланшет 4 раза с использованием 350 мкл промывочного раствора (R2). Переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
- Вдали от яркого света** быстро внесите 200 мкл раствора хромогена (R9) в каждую лунку. **Выполните инкубацию микропланшета в темноте при комнатной температуре ($+18-30^{\circ}\text{C}$) в течение 30 ± 5 минут.** Не используйте клейкую пленку во время этой стадии инкубации.

16. Прекратите ферментативную реакцию, добавив 100 мкл стоп-раствора (R10) в каждую лунку. Внесение выполните в той же последовательности и в том же ритме, что и для проявляющего раствора.
17. Тщательно протрите дно микропланшета. С помощью сканера микропланшетов считайте значение оптической плотности каждой лунки при длине волны 450/620 нм в течение 30 минут с момента прекращения реакции. Стрипы всегда следует держать вдали от прямого света перед процедурой считывания.
18. Проверьте соответствие между выходными данными считывающего устройства и графиком внесения растворов на микропланшет перед расшифровкой результатов.

8 – ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Вычисление показателя авидитета

Показатель авидитета (AI) образца представляет собой отношение оптических плотностей (ОП), измеренных при помощи диссоциирующего раствора (R13) и контрольного раствора (R12):

$$AI = OD_{\text{Образца R13}} / OD_{\text{Образца R12}}$$

Вычисление AI образца возможно, только если ОП, полученная при помощи контрольного раствора, превышает 0.2.

Для образцов, разведенных в пропорции 1/101, для которых полученная при помощи контрольного раствора ОП меньше либо равна 0.2, рекомендуется провести повторное тестирование, но с разведением в пропорции 1/21.

Для образцов, разведенных в пропорции 1/21, для которых полученная при помощи контрольного раствора ОП меньше либо равна 0.2, концентрация антител к ЦМВ класса IgG слишком мала, и авидитет посчитать невозможно.

8.3 Контроль качества

Используйте контрольные образцы на каждом микропланшете всякий раз при проведении теста и с их помощью анализируйте полученные результаты. Для подтверждения анализа должны быть удовлетворены следующие критерии:

- **Значения оптической плотности, полученные с контрольным раствором (R12):**
ОП R5a $\geq$ 0.250
ОП R5b $\geq$ 0.750
- **Показатели авидитета**
AI R5a $<$ 0.35
AI R5b $\geq$ 0.60

Если данные критерии не выполнены, следует провести ещё одну серию тестов.

8.4 Интерпретация результатов

Показатель авидитета (AI)	Интерпретация
AI $<$ 0.40	Зона низкого авидитета

$0.40 \leq AI < 0.55$	Серая авидитетная зона
$AI \geq 0.55$	Зона высокого авидитета

Показатели авидитета со значением ниже 0,40 более характерны для недавней первичной инфекции, возникшей менее 3 месяцев назад. Однако такой результат не позволяет подтвердить диагноз с абсолютной точностью.

Показатели авидитета со значением 0,55 и выше более характерны для прошлой инфекции, перенесенной более 3 месяцев назад. Однако такой результат не позволяет с абсолютной точностью исключить наличие недавней первичной инфекции, возникшей менее 3 месяцев назад.

Если возникло подозрение на недавнее инфицирование или показатель авидитета находится в серой зоне, то для подтверждения диагноза рекомендовано повторное тестирование (обратитесь к действующему законодательству касательно контроля над пациентами).

8.4 Руководство по поиску и устранению неисправностей

Неподтвержденные или неповторяющиеся реакции, как правило, вызваны:

- Неправильной температурой реагентов.
- Некорректной промывкой микропланшетов.
- Неверным разведением образцов.
- Контаминированием отрицательных образцов сывороткой крови или плазмой с высоким титром антител.
- Контаминированием проявляющего раствора химическими окислителями (дезинфектантами, ионами металлов...).
- Контаминированием стоп-раствора.

9 – ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Клинические исследования

Эксплуатационные характеристики анализа Platelia™ CMV IgG AVIDITY оценивались на основе исследования 366 образцов, взятых преимущественно у беременных женщин, проведенного в одной из лабораторий Франции.

Перспективное исследование было проведено на основе 144 образцов, которые изначально дали положительный результат при тестировании анализом Platelia™ CMV IgG (72810). Результаты анализа Platelia™ CMV IgG AVIDITY прошли сравнение с результатами, полученными при использовании коммерческого ИФА-теста на авидитет IgG в качестве эталона. Процент совпадений между тестами составил 98.6% (142/144). Два образца продемонстрировали мелкие несоответствия: средний авидитет у анализа Platelia™ CMV IgG AVIDITY и высокий авидитет у коммерческого теста (n=1); высокий авидитет у анализа Platelia™ CMV IgG AVIDITY и средний авидитет у коммерческого теста (n=1).

Ретроспективное исследование было проведено на основе 200 образцов пациентов с прошлой инфекцией ЦМВ, из них:

- 100 образцов, выявивших положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG и отрицательный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM, а также высокий показатель авидитета при диагностике коммерческим ИФА-тестом на авидитет IgG;
- 100 образцов, выявивших положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG и класса IgM, а также высокий показатель авидитета при диагностике коммерческим ИФА-тестом на авидитет IgG.

Все образцы пациентов с прошлой инфекцией, давшие отрицательный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgM, продемонстрировали высокий показатель авидитета при тестировании Platelia™ CMV IgG AVIDITY (100/100).

Среди образцов пациентов с прошлой инфекцией, положительных на наличие антител к ЦМВ класса IgM, у 97 был выявлен высокий показатель авидитета, подтвержденный результатами коммерческого ИФА-теста на авидитет IgG. Для 3 остальных образцов было получено среднее значение авидитета при тестировании набором Platelia™ CMV IgG AVIDITY.

Также были проанализированы 22 образца с первичной инфекцией ЦМВ, включая 4 образца с сероконверсией. 21 из них имели низкий показатель авидитета. Только один образец продемонстрировал средний показатель авидитета (AI=0.41). У предыдущего образца данного пациента, взятого 48 днями ранее, был обнаружен низкий показатель авидитета.

Помимо этого, тестирование было проведено на 3 коммерческих наборах образцов с сероконверсией (PTC901, RP003 и RP019). Образцы, взятые в течение 80-дневного периода с момента последнего отрицательного результата на наличие антител класса IgG, продемонстрировали низкий показатель авидитета.

9.2 Точность

Исследование точности тестирования было проведено на примере 6 образцов, показавших положительный результат на наличие антител к ЦМВ класса IgG, при этом 3 из них были разведены в пропорции 1/101 и 3 – в пропорции 1/21.

- Точность в пределах серии тестов (повторяемость):

Чтобы оценить повторяемость результатов в пределах анализа, в ходе одной серии были протестированы шесть образцов 30 раз. Для каждого образца был определен показатель авидитета. Среднее значение AI, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариативности (%CV) для каждого из 6 образцов приведены в следующей таблице:

Точность в пределах одной серии тестов (повторяемость)

N=30	Низкий AI 1/101	Средний AI 1/101	Высокий AI 1/101	Низкий AI 1/21	Средний AI 1/21	Высокий AI 1/21
Среднее	0.25	0.55	0.88	0.20	0.49	0.70
SD	0.018	0.015	0.037	0.008	0.020	0.015
%CV	7.3%	2.7%	4.3%	4.0%	4.1%	2.2%

- Точность в пределах серии тестов (воспроизводимость):

Чтобы оценить воспроизводимость в пределах одного теста, шесть образцов были протестированы в двух экземплярах в двух сериях тестов в день в течение 20-дневного периода. Для каждого образца был определен показатель авидитета. Среднее значение AI, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариативности (%CV) для каждого из образцов приведены в следующей таблице:

Точность в пределах серии тестов (воспроизводимость)

N=80	Низкий AI 1/101	Средний AI	Высокий AI 1/101	Низкий AI 1/21	Средний AI 1/21	Высокий AI 1/21
------	--------------------	------------	---------------------	-------------------	--------------------	--------------------

		1/101				
Среднее	0.24	0.49	0.82	0.13	0.41	0.61
SD	0.026	0.032	0.045	0.015	0.029	0.035
%CV	10.6%	6.4%	5.5%	12.0%	6.9%	5.7%

10 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Диагноз инфицирования ЦМВ может быть поставлен только после изучения совместно клинических и биологических данных. Результат единичного исследования титрования антител к ЦМВ класса IgG не является достаточным основанием для установления диагноза о недавнем инфицировании цитомегаловирусом.

11 – КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Все произведенные реагенты приготовлены в соответствии с нашей Системой Качества, начиная с получения сырья и заканчивая организацией серийного производства конечного продукта. Каждая партия подвергается оценке с позиций контроля качества и выпускается на рынок только после соответствия предустановленному критерию принятия. Все документы, касающиеся производства и управления каждой партией, хранятся в пределах компании Bio-Rad.

12 – БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

1. Alford C.A., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J. 1990. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. Rev. Infect. Dis. **12**: S745-S753.
2. Demmler G.J. 1991. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev. Infect. Dis. **13**: 315-329.
3. Fowler K.B., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J., Boll T.J., Alford C.A. 1990. The outcome of congenital and cytomegalovirus in relation to maternal antibody status. N. Engl. J. Med. **326**: 663-667.
4. Gaytant M.A., Rours I.G., Steegers E.A., Galama J.M., Semmekrot B.A. 2003. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. Europ. J. Pediatr. **162**: 248-253.
5. Grangeot-Keros L., Mayaux M.J., Lebon P., and al. 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. J. Infect. Dis. **175**: 944-946.
6. Lazzarotto T., Guerra B., Spezzacatena P., Varani S., Gabrielli L., Pradelli P., Rumpianesi F., Banzi C., Bovicelli L., Landini M.P. 1998. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J. Clin. Microbiol. **36**: 3540-3544.
7. Macé M., Sissoef L., Rudent A., Grangeot-Keros L. 2004. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. Prenat. Diagn. **28**: 861-863.
8. Munro S.C., Hall B., Whybin L.R., Leader L., Robertson P., Maine G.T., Rawlinson W.D. 2005. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. J. Clin. Microbiol. **43**: 4713-4718.
9. Revello M.L., Gerna G. 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. Clin. Microbiol. Rev. **15**: 680-715.

10. **Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., and al.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infections. N. Engl. J. Med. **306**: 945-949.

