



ImmunoComb®

Toxo IgM



Code: 50441002

Format: 3 x 12 tests

Только для *in vitro* диагностики

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00769
от 15 июня 2009 г.

Назначение

ИФА тест-система ИммуноКомб «ImmunoComb® Toxo IgM» - это быстрый тест для качественного выявления IgM антител к *Toxoplasma gondii* (Toxo) в сыворотке или плазме человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Токсоплазмоз (*Toxoplasmosis*) - это системное заболевание, вызываемое простейшими микроорганизмами *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Этот паразит широко распространен и способен инфицировать многие виды млекопитающих, особенно часто встречается в тропиках и реже в холодных, безводных регионах. Серологические исследования выявили частоту инфицирования данным заболеванием менее 1% среди молодежи в некоторых регионах и до 90% среди людей пожилого возраста в других регионах. Основные пути передачи инфекции человеку - врожденный и оральный, при употреблении зараженной пищи. Реже встречается, но имеет важное клиническое значение, передача инфекции от человека к человеку через зараженные продукты крови и трансплантаты.

Наиболее общим клиническим проявлением инфекции является сама собой проходящая фебрильная лимфаденопатия, протекающая субклинически или со слабыми клиническими проявлениями у здоровых взрослых. Тем не менее, инфицирование пациента с нарушенной иммунной системой или инфицирование развивающегося плода может привести к весьма серьезным последствиям. Оппортунистический токсоплазмоз или реактивация субклинической инфекции у пациента с подавленной иммунной системой может вызвать энцефалит, пневмонию и миокардит, часто с летальным исходом.

У врожденно-инфицированного плода инфекция может распространиться на центральную нервную систему. Последствиями могут быть выкидыши и мертворожденные, если инфицирование происходит в течение первого триместра

беременности, и необратимые неврологические повреждения в случае инфицирования во втором и третьем триместре беременности.

Значительные уровни IgM антител к *T. gondii* как правило не сохраняются дольше 1 года с первичной инфекции и не наблюдаются во время реактивации. Следовательно, качественная проверка на IgM антитела к *T. gondii* позволяет быстро подтвердить острую форму или недавно перенесенную инфекцию. Тестирование на IgM и IgG антитела к *T. gondii* у новорожденных, с одновременной проверкой на материнские IgG антитела к *T. gondii* позволяет проводить диагностику врожденного токсоплазмоза.

Принцип анализа

В тест-системе ImmunoComb® Toxo IgM используется метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами). Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах:

верхняя точка — IgM человека (Внутренний Контроль)

нижняя точка — инактивированными антигенами *T. gondii*

Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A - F) по 12 лунок в каждом. Все ряды содержат готовые к использованию растворы реагентов для различных этапов анализа. Анализ проводится поэтапно, Гребень последовательно переносится из одного ряда лунок в другой с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа образцы сыворотки или плазмы крови человека предварительно обрабатываются антителами к IgG человека (очищающий раствор), чтобы избежать помех, связанных с конкурирующим взаимодействием IgG антител к *T. gondii* и Ревматоидного фактора (RF). Предварительно обработанные образцы инкубируются в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляется Гребень. IgM антитела к *T. gondii*, если они присутствуют в образце, специфически связываются с антигенами токсоплазмы на нижних точках зубцов Гребня (Рис. 1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С IgM антитела к *T. gondii*, захваченные нижними точками зубцов и IgM человека на верхних точках (Внутренний контроль) взаимодействуют с антителами к IgM человека, мечеными щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase, AP). В следующих двух рядах (С и D) не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В ряду F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенным субстратом. Результаты реакции наблюдаются визуально в виде серо-синих точек на поверхности зубцов Гребня.

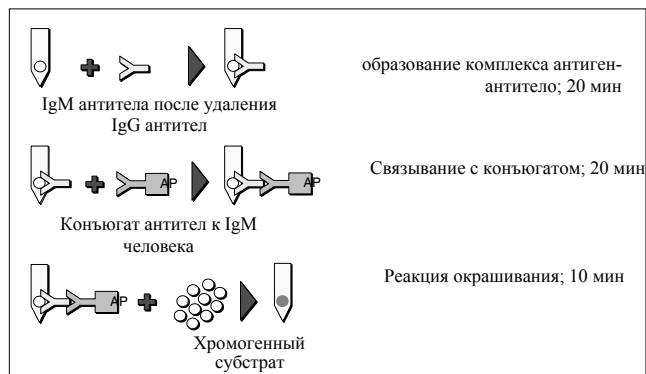


Рис. 1 Принцип Анализа

В набор входит Положительный контроль, содержащий IgM антитела к *T. gondii* и Отрицательный контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов. По завершении анализа, на зубце с Положительным Контролем должны проявиться две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна проявиться верхняя точка. Нижняя точка либо отсутствует, либо слабоокрашена. Верхняя точка должна проявиться на всех остальных зубцах, подтверждая, что тест-система не была повреждена во время хранения и транспортировки, и анализ проведен правильно.

Состав набора

Гребни

В Набор входят 3 пластиковых Гребня. Каждый Гребень имеет 12 зубцов, по 1 зубцу на каждый тест (Рис. 2). Каждый зубец сенсibilизирован в двух чувствительных областях:

верхняя точка — IgM человека (Внутренний Контроль)

нижняя точка — инактивированными антигенами *T. gondii*

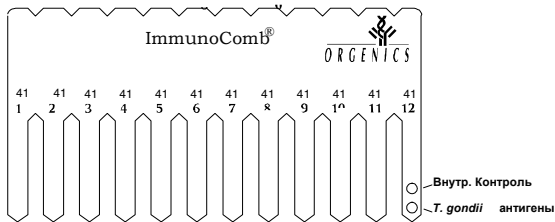


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в специальных упаковках с влагопоглотителем.

Проявочные ванны

В набор входят 3 Проявочных ванны. Каждая из них (Рис. 3) содержит все необходимые для проведения анализа реагенты. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A-F) по 12 лунок в каждом. Содержимое каждого ряда следующее:

Ряд А	разбавитель образца, содержащий козы антитела к IgG человека	растворитель пробы, содержащий goat antibodies to human IgG
Ряд В	промывочный раствор	Промывочный раствор
Ряд С	козы антитела к IgM человека, меченые щелочной фосфатазой (AP)	Goat anti-human IgM antibodies, меченные щелочной фосфатазой
Ряд D	промывочный раствор	Промывочный раствор
Ряд E	промывочный раствор	Промывочный раствор
Ряд F	раствор хромогенного субстрата (окрашивающего вещества), содержащий 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)	раствор окрашивающего вещества, содержащий 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT)

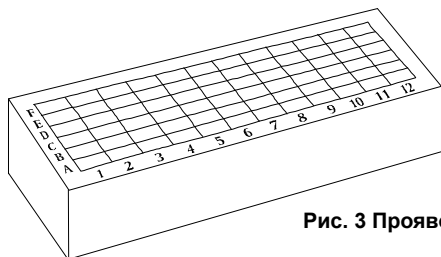


Рис. 3 Проявочная ванна

Положительный Контроль — 1 флакон (красная крышка) 0.15 мл инактивированной нагреванием разведенной плазмы крови человека, содержащей IgM антитела к *T. gondii*.

Отрицательный Контроль — 1 флакон (зелёная крышка) 0.15 мл разведенной реконструированной плазмы крови человека, инактивированной нагреванием, отрицательной по антителам к токсоплазме.

Очищающий раствор - 1 флакон, содержащий 4 мл разведенных козых антител к IgG человека.

Перфоратор — пластиковый стержень для прокалывания алюминиевой фольги, покрывающей лунки Проявочной ванны.

Меры Предосторожности

Биоматериалы, использованные при приготовлении набора, были проверены на наличие вируса гепатита В, на наличие антител к вирусу гепатита С и к ВИЧ и показали отрицательный результат. Поскольку ни один тест не может дать полной гарантии в отсутствии вирусного заражения, при работе с исследуемыми образцами и контрольными растворами следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом:

- Используйте хирургические перчатки и лабораторную одежду. Следуйте принятым лабораторным процедурам для работы с человеческой сывороткой или плазмой.
- Не всасывайте растворы в пипетку ртом.

- Обращайтесь со всеми образцами, использованными Гребнями*, Проявочными ваннами и другими материалами в наборе как с потенциально опасными отходами.
- Не смешивайте реагенты из наборов разных серий.
- Не используйте набор после срока годности.

Срок годности, условия хранения и транспортировки

- Срок годности - 12 месяцев.
- Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре 2-8°C. Не допускать замораживания.
- Возможна транспортировка в течение 3-5 суток при температуре не превышающей 26°C. Внутренний контроль тест-системы подтверждает сохранность реагентов при транспортировке.
- После вскрытия набора хранить составляющие его компоненты при температуре 2-8°C.
- Не рекомендуется использовать Гребень и Проявочную ванну более 3 раз после первичного использования.

Подготовка образцов

- Можно анализировать либо сыворотку, либо плазму крови человека.
- Образцы перед анализом можно хранить до 7 дней при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения образцы должны быть заморожены до температуры -20°C или ниже.
- После оттаивания все замороженные исследуемые материалы должны быть отцентрифугированы. Аккуратно заберите исследуемый образец из супернатанта (верхний слой). Если на поверхности жидкости образовался липидный слой, убедитесь, что материал для исследования был взят из нижнего прозрачного слоя. Избегайте повторных замораживаний и оттаиваний.
- Антикоагулянты, такие как гепарин, EDTA, цитрат натрия не влияют на результаты теста.
- При экстренных анализах можно использовать цельную кровь (венозную, пальцевую) в количестве, в 2 раза превышающем количество сыворотки или плазмы, указанное в инструкции к тест-системе.

Процедура анализа

Необходимое оборудование

- Прецизионные пипетки - дозаторы со сменными наконечниками для внесения 10 мкл, 25 мкл и 100 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.
- Микропипетки или микротитратор с лунками.

Подготовка к анализу

Доведите все компоненты, Гребни, реагенты и образцы до комнатной температуры (22-26°C), процедуру анализа проводите при этой же температуре.

Подготовка Проявочной ванны.

1. Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут; либо при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов. Перенесите необходимые для проведения анализа компоненты набора (Гребень, образцы, контроли, очищающий раствор) в помещение с комнатной температурой
2. Накройте рабочий стол фильтровальной бумагой, которая после окончания работы должна быть уничтожена как биологически опасные отходы.
3. Перемешайте реагенты, встряхивая Проявочную ванну.

Примечание: Не удаляйте всю фольгу, покрывающую Проявочную ванну. Вскрывайте фольгу только в соответствии с указаниями инструкции по проведению анализа с помощью сменного наконечника пипетки или перфоратора.

Подготовка Гребня

Внимание: Чтобы обеспечить правильное функционирование теста, не прикасайтесь к зубцам Гребня.

1. Разорвите алюминиевую упаковку с Гребнем вдоль надсеченного края. Извлеките Гребень.
2. Можно использовать Гребень и Проявочную ванну

* За исключением хранения для документации

целиком, либо только их часть. Для использования части Гребня:

- Определите количество зубцов, необходимое для анализа образцов и контролей. На каждый тест требуется по одному зубцу. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "41" для дальнейшего определения принадлежности к набору его отделенных зубцов.
- Согните Гребень по вертикали и сломайте или отрежьте ножницами (см. Рис. 4) требуемое число зубцов.
- Верните неиспользуемую часть Гребня в алюминиевую упаковку с влагопоглотителем. **Плотно закройте упаковку**, например, канцелярской скрепкой, чтобы избежать проникновения влаги. Храните Гребень в оригинальной упаковке набора при температуре 2–8°C для дальнейшего использования.

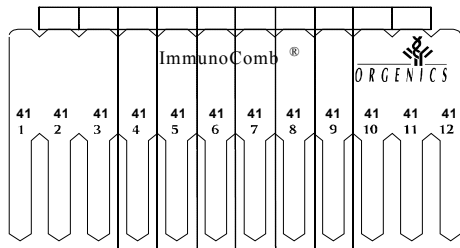


Рис. 4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Предварительная обработка образцов и контролей.

- Для каждого образца и контроля введите по 100 мкл очищающего раствора в микропробирку или лунку микротитратора.
- В каждую микропробирку или лунку добавьте 10 мкл образца либо контроля, входящих в состав набора. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.
- Включите таймер, инкубируйте 10 минут.

Добавление предварительно обработанных образцов в Проявочную ванну

- Наберите в пипетку 25 мкл предварительно обработанного образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором фольгу в одной из ячеек ряда А Проявочной ванны и введите обработанный образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
- Повторите этап 4 для других предварительно обработанных образцов и контролей. Используйте новую лунку ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца или контроля.
- Включите таймер. Инкубируйте 10 минут.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А)

- Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание:** Вставляйте и вынимайте Гребень из лунок несколько раз.
 - Оставьте Гребень в лунках ряда А на 20 минут. Включите таймер. За несколько секунд до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимые для теста лунки.
 - По окончании инкубации извлеките Гребень из лунок ряда А. **Удалите оставшуюся жидкость с заостренных концов зубцов Гребня** при помощи фильтровальной бумаги. Не касайтесь фронтальной поверхности зубцов Гребня.

Первая промывка (Ряд В)

- Введите Гребень в лунки ряда В. **Прополощите:** энергично вынимайте и вставляйте Гребень в лунки в течение 10 секунд для более тщательной промывки. Повторите прополаскивание несколько раз в течение 2 минут; между тем проколите фольгу лунок ряда С. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости** как на этапе 7с.

Связывание с Конъюгатом (Ряд С)

- Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Перемешайте** как на этапе 7а. Включите таймер на 20 минут. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 20 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд D)

- Введите Гребень в лунки ряда D. **Прополощите** в течение 2 минут, как на этапе 8. Тем временем проколите фольгу в лунках ряда E. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Третья промывка (Ряд E)

- Вставьте Гребень в лунки ряда E. **Прополощите** в течение 2 минут. Тем временем проколите фольгу в лунках ряда F. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Цветная реакция (Ряд F)

- Вставьте Гребень в лунки ряда F. **Перемешайте**. Включите таймер на 10 минут. Через 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд E)

- Вставьте Гребень снова в лунки ряда E. Через 1 минуту извлеките гребень и просушите его на воздухе.

Хранение неиспользованных частей набора

Проявочные ванны

Неиспользованные лунки Проявочной ванны можно хранить для дальнейших тестирований

- Заклейте широкой лентой использованные лунки Проявочной ванны, во избежание пролития ее содержимого в случае ее опрокидывания.

Другие материалы набора:

- Верните оставшиеся Проявочные ванны, Гребни, перфоратор, средства контроля, очищающий раствор и инструкцию обратно в оригинальную коробку. Храните при температуре 2–8°C.

Результаты анализа

Достоверность

Для подтверждения правильной работы теста и достоверности полученных результатов необходимо соблюдение трёх условий (см. Рис.5):

- На зубце с **Положительным контролем** должно проявиться **две точки**.
- На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать **верхняя точка** (Внутренний Контроль). Нижняя точка либо отсутствует, либо она слабоокрашенная и не влияет на интерпретацию результатов.
- На каждом зубце тестируемых образцов должна проявиться **верхняя точка** (Внутренний Контроль).

Если одно из трёх вышеперечисленных условий не соблюдается, результаты анализа считаются недействительными, образцы и контроли должны исследоваться повторно.



Рис. 5. Достоверность результата

Качественная интерпретация результатов

Визуальная интерпретация.

Сравните интенсивность окрашивания **нижней точки** каждого зубца исследуемых образцов с интенсивностью окрашивания **нижней точки** зубца Положительного Контроля (Рис.6).

- Точка с интенсивностью окраски **большей** или **равной** точке Положительного Контроля указывает на **положительный результат**.
- Отсутствие** точки или точка с **меньшей** интенсивностью окрашивания, чем у Положительного Контроля указывает на **отсутствие** IgM антител к *T. gondii* в образце (Отрицательный Результат).



Рис. 6 Результаты теста

Документация результатов

Так как окраска точек стабильна, Гребни можно хранить для дальнейшей документации.

Ограничения

Результаты этого анализа, как и результаты любых других анализов, предназначенных для диагностики *in vitro*, следует рассматривать в совокупности со всеми симптомами, клинической историей и результатами других лабораторных обследований пациента.

Показатели качества теста*

Чувствительность и специфичность тест-системы **ImmunoComb® Toxo IgM** были проверены на 160 образцах сыворотки и сравнивались с ИФА референс методом. Несовпадающие результаты тестировались методом непрямой иммунофлюоресценции, а также методом агглютинации. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты испытаний

Контрольный метод	ImmunoComb® Toxo IgM	
	Положительный	Отрицательный
Положительный	14	1
Отрицательный	0	145**

** Включает один образец положительный согласно ИФА методу, но отрицательный в остальных исследованиях.

Следующие показатели качества были вычислены исходя из этих результатов:

- Чувствительность – 93.3 %
- Специфичность – 100 %

Библиография

1. **Desmonts G.** 1982. Toxoplasmosis acquired from the female. Lyon Medical 248: 115-123.
2. **Krogstad DJ, Visvesvara GS, Walls KW, Smith JW.** 1991. Blood and tissue protozoa. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology, Fifth edition. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 829-837.
3. **Remington JS, Krahenbuhl JL.** 1982. Immunology of Toxoplasma gondii. In: Nahmias AJ, O'Reilly RJ, eds. Immunology of Human Infection, Part II. Plenum, New York, pp 327-371.

* Подробные данные предоставляются по требованию.

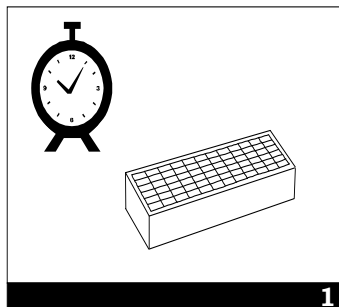
Условные Обозначения

	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контроль
	Отрицательный Контроль
	Перфоратор
	Очищающий раствор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы
	Изделие медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
	Ограничения температуры
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
	Уполномоченный представитель в ЕС
	Каталожный номер
	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
	Серийный номер

Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»
 Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
 тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

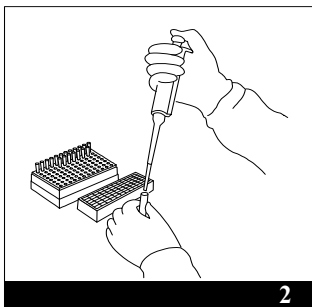
 Orgenics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 <small>©2008 Inverness Medical. All rights reserved</small>	 MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22 Version: 50441002/R5/OR (03/2009)

Описание основных этапов анализа



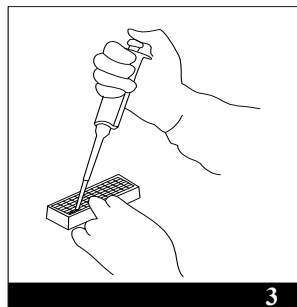
1

Предварительная Подготовка Проявочной ванны:
- инкубация 3 часа при комнатной температуре или
- 20 мин. при 37°C



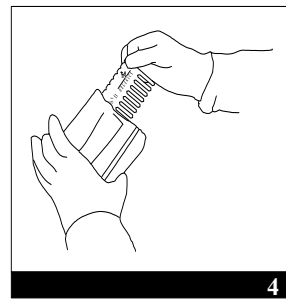
2

Забор образцов и контролей для предварительной обработки



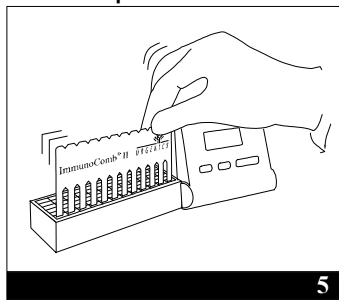
3

Добавление обработанных образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание



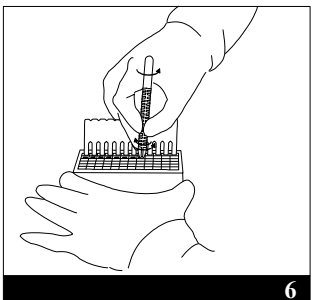
4

Извлечение Гребня из упаковки



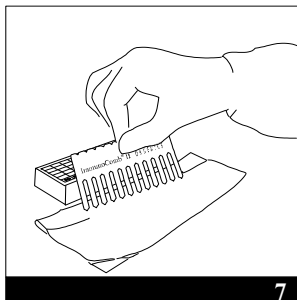
5

Введение Гребня в лунки ряда А и перемешивание. Инкубация



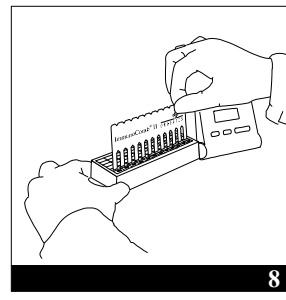
6

Вскрытие лунок ряда В перфоратором



7

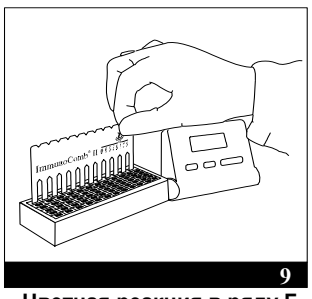
Удаление капель жидкости с зубцов Гребня



8

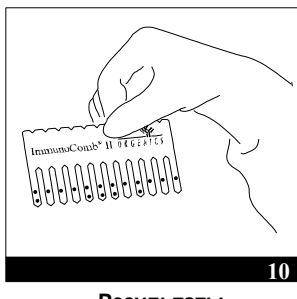
Введение Гребня в лунки ряда В. Перемешивание. Инкубация.

После перемешивания / полоскания и инкубации в рядах С, D и E ...



9

Цветная реакция в ряду F



10

Результаты

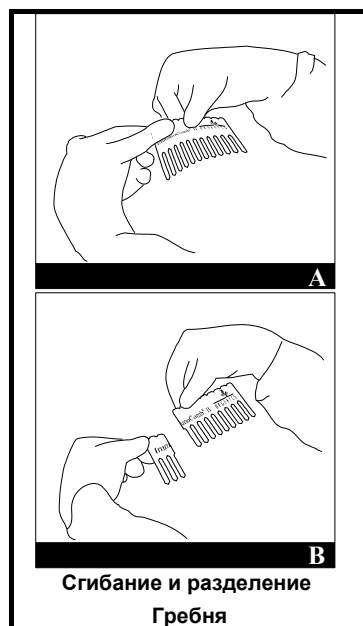
Краткое описание процедуры анализа

Прилагаемая краткая инструкция предназначена для опытных пользователей набора ImmunoComb® Toxo IgM (Полная инструкция приведена выше).

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов, довести все необходимые компоненты набора до комнатной температуры. Проводить анализ при комнатной температуре (22-26°C).
2. Внесите по 10 мкл каждого образца и контроля в микропипетки или лунки микротитратора, смешайте со 100 мкл очищающего раствора и инкубируйте на протяжении 10 минут.
3. Внесите по 25 мкл каждого предварительно обработанного образца и контроля в лунки ряда А Проявочной ванны. Перемешайте и инкубируйте на протяжении 10 минут.
4. Вставьте Гребень в лунки ряда А и продолжайте анализ в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Этап	Ряд	Действия
Реакция антиген - антитело	A	Перемешайте; инкубация 20 мин.; удалите капли
Промывка	B	Прополощите; инкубация 2 мин.; удалите капли
Связывание с конъюгатом	C	Перемешайте; инкубация 20 мин.; удалите капли
Промывка	D	Прополощите; инкубация 2 мин.; удалите капли
Промывка	E	Прополощите; инкубация 2 мин.; удалите капли
Окрашивание	F	Перемешайте; инкубация 10 мин.;
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин.; сушка на воздухе



Сгибание и разделение Гребня