



ImmunoComb® II

ИммуноКомб® II
HCV


ORGENICS

CE
0459

Code: 60455002

Format: 3 x 12 tests

Только для *in vitro* диагностики

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00768
от 17 декабря 2007 г.

Назначение

ИФА тест-система ИммуноКомб «ImmunoComb® II HCV» это быстрый бесприборный тест для дифференцированного выявления IgG антител как к структурным, так и неструктурным белкам вируса гепатита С (HCV) в сыворотке или плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Вирус гепатита С (ВГС) был идентифицирован в 1989 году в качестве этиологического агента посттрансфузионного гепатита не А- и не В-типа. Вирус состоит из одиночного скрученного 10 Kb РНК-генома, защищенного нуклеокапсидом и липопротеиновой мембраной. Геном ВГС кодирует структурные белки (core и envelope – коровые и оболочные) и неструктурные белки (с NS2 до NS5). На основании структуры и морфологических особенностей, ВГС был отнесен к Flaviviridae.

Передача ВГС происходит преимущественно парентерально, в основном в результате переливания крови, воздействия крови и ее препаратов или в результате случайного контакта с зараженным медицинским оборудованием. Недавние исследования предполагают половой путь передачи как дополнительный способ распространения вируса.

Считается, что среди населения в группах риска серопозитивность достигает следующих значений: от 0,18 — 0,8% у доноров крови и 9% у пациентов с гемодиализом, до 50% у внутривенных наркоманов и 70% у больных гемофилией.

Инфицирование гепатитом С обычно имеет инкубационный период 5-12 недель с последующим бессимптомным или мягким острым заболеванием течением с проявлениями, напоминающими острую инфекцию гепатита А или гепатита В. До 50% острых случаев быстро перерастает в хроническую инфекцию. Клинические проявления хронической инфекции гепатита С обычно слабые и ограничиваются астенией. Однако болезнь может, в конце концов, перерасти в цирроз печени или гепатокарциному.

В течение длительного периода диагностика гепатита С осно-

вывалась на обнаружении повышенных уровней аланин-амино-трансаминазы (ALT), сохраняющихся по крайней мере, на протяжении 6 месяцев в отсутствии других причин для хронического цитолиза. Идентификация ВГС как этиологического агента сделала возможной диагностику этого заболевания такими методами, как иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ИФА тест-система «ИммуноКомб® II HCV» - быстрый и чувствительный тест для дифференцированного выявления антител к структурным и неструктурным белкам ВГС, в том числе для экспресс-диагностики, для скрининга банка крови, для экстренного и индивидуального обследования, в т. ч. предполагаемых носителей ВГС.

Принцип Анализа

В тест-системе «ИммуноКомб® II HCV» используется метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 зубцами. Каждый зубец сенсibilизирован в трех местах (Рис.1):

верхняя точка - иммуноглобулином человека (внутренний контроль),

средняя точка - коровым антигеном ВГС,

нижняя точка - неструктурными антигенами ВГС (NS3, NS4 и NS5).

Проявочная ванна имеет 6 рядов (А - F) из 12 лунок, каждый ряд содержит готовые к использованию растворы реагентов для различных стадий анализа. Анализ проводят, последовательно перемещая Гребень из одного ряда лунок в другой, с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа исследуемые образцы сыворотки или плазмы добавляют к разбавителю в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляют Гребень. Антитела к ВГС, если они присутствуют в образце, специфически связываются с антигенами ВГС на нижней и средней точках зубца Гребня (Рис. 1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С IgG антитела к ВГС, захваченные нижней и средней точками зубцов, и иммуноглобулин человека верхних точек (Внутренний контроль) будут взаимодействовать с антителами против IgG человека, меченными щелочной фосфатазой (AP-конъюгат). В следующих двух рядах лунок не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В лунках ряда F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенным субстратом. Результаты реакции наблюдают в виде серо-синих точек на поверхности зубца Гребня.

В набор входит положительный контроль (содержащий IgG-антитела к ВГС) и отрицательный контроль, которые используют при анализе каждой группы образцов. По завершении анализа на зубце с положительным контролем должны проявиться три серо-голубые точки. На зубце с отрицательным контролем должна появиться только верхняя точка. Верхняя точка должна появиться на всех зубцах, подтверждая, что набор работает правильно и тест выполнен корректно.

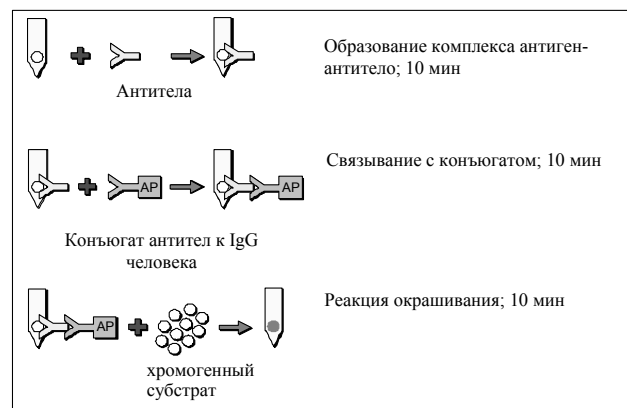


Рис. 1. Принцип непрямого твердофазного ИФА

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 трёх чувствительных областях:

верхняя точка (1) – иммуноглобулин человека (внутренний контроль),

средняя точка (2) - коровый антиген ВГС,

нижняя точка (3) - неструктурные антигены ВГС (NS3, NS4 и NS5).

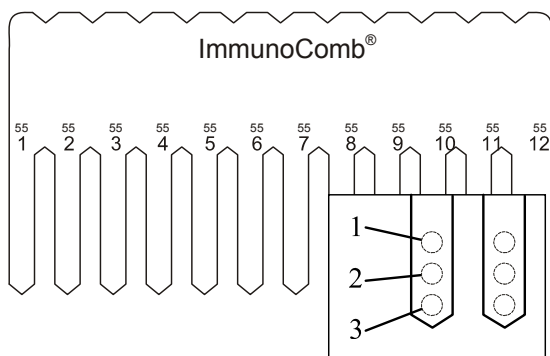


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках, содержащих влагопоглотитель.

Проявочные ванны

В набор входят 3 Проявочные ванны, покрытые алюминиевой фольгой. 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	растворитель образца
Ряд В	промывочный раствор
Ряд С	козьи антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой (AP-конъюгат)
Ряд D	промывочный раствор
Ряд E	промывочный раствор
Ряд F	раствор хромогенного субстрата (окрашивающего вещества), содержащий 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)

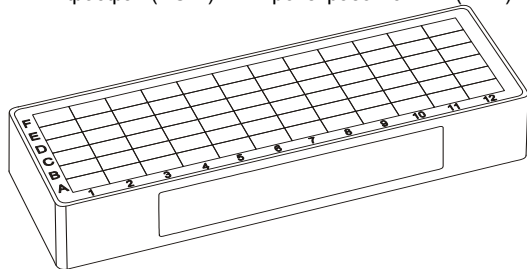


Рис. 3 Проявочная ванна.

Положительный Контроль - 1 флакон (красная крышка) 0.75 мл инактивированной нагреванием разбавленной плазмы крови человека, содержащей антитела к ВГС.

Отрицательный Контроль - 1 флакон (зелёная крышка) 0.75 мл инактивированной нагреванием разбавленной плазмы крови человека, не содержащей антител к ВГС.

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

Меры Предосторожности

Обращайтесь с положительным контролем как с потенциально инфекционным материалом, не смотря на то, что он был инактивирован.

Все остальные 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.

* За исключением хранения для документации

- 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.
- Все замороженные исследуемые материалы должны быть отцентрифугированы при 10000 g в течение 5 минут при комнатной температуре. 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.

Процедура анализа

Необходимое оборудование

- Прецизионные пипетки - дозаторы со сменными наконечниками для внесения 50 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.

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) в помещение с комнатной температурой.
2. Застелите 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. Вскрывать 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 надсечённого края. Извлеките Гребень.
2. Можно использовать Гребень и Проявочную ванну целиком, либо только их часть. Для использования части Гребня:
 - a. Определите количество зубцов, необходимое для анализа образцов и контролей. На каждый тест требуется по одному зубцу. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "55" для дальнейшего определения принадлежности к набору его отделенных зубцов.
 - b. Согните Гребень по вертикали и сломайте или отрежьте ножницами (см. Рис. 4) требуемое число зубцов.
 - c. 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.

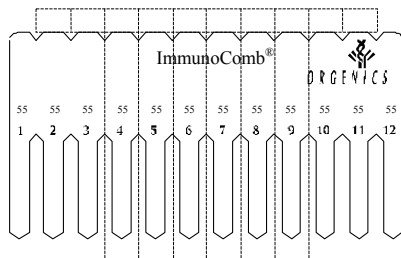


Рис. 4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А)

1. Наберите в пипетку 50 мкл образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором покрытие из фольги над одной из лунок ряда А Проявочной ванны и введите образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор в лунку. Смените наконечник пипетки.
2. Повторите этап 1 для всех остальных образцов и контролей. Используйте новую лунку из ряда А и меняйте наконечники пипеток для каждого образца или контроля.
3.
 - a. Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание**: Вынимайте и вставляйте Гребень в лунки несколько раз.
 - b. Оставьте Гребень в лунках ряда А, выдержите 10 минут. Включите таймер. Время от времени **перемешивайте** во время инкубации, вынимая и вставляя гребень. Перед окончанием 10 минут проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
 - c. Через 10 минут извлеките Гребень из лунок ряда А. **Удалите капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня** с помощью чистой фильтровальной бумаги. Не прикасайтесь к фронтальной поверхности Гребня.

Первая промывка (Ряд В)

4. Вставьте 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 3с.

Связывание с конъюгатом (Ряд С)

5. Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Перемешайте** как на этапе 3а. Выдержите Проявочную ванну с Гребнем 10 минут (включите таймер). **Перемешайте** как на этапе 3б. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 10 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд D)

6. Вставьте Гребень в лунки ряда D. **Перемешайте** как на этапе 4 в течение 2 минут. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Третья промывка (Ряд Е)

7. Вставьте Гребень в лунки ряда Е. Несколько раз **прополощите** в течение 2 минут. В промежутках проколите фольгу лунок ряда F. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Цветная реакция (Ряд F)

8. Вставьте Гребень в лунки ряда F. **Перемешайте**. Выдержите Проявочную ванну с Гребнем 10 минут (включите таймер). По окончании 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд Е)

9. Снова вставьте Гребень в лунки ряда Е. По истечении 1 минуты извлеките Гребень и просушите его на воздухе.

Хранение неиспользованных частей набора

Проявочная ванна

Неиспользованные лунки Проявочной ванны можно хранить для дальнейшего применения:

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

Другие компоненты набора

- Верните оставшиеся Проявочные ванны, Гребни, перфоратор,

60455002/R6/OR/CE

контроли и инструкции обратно в оригинальную коробку набора. Храните при температуре 2–8°C.

Результаты анализа

Достоверность

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

1. На зубце с **Положительным контролем** должно проявиться **три** точки.
2. На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать **верхняя** точка (Внутренний Контроль) и никаких других точек.
3. На каждом зубце тестируемых **образцов** должна проявиться **верхняя** точка (Внутренний Контроль).



Рис. 5 Достоверность результата

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

Интерпретация Результатов при Визуальном Учете

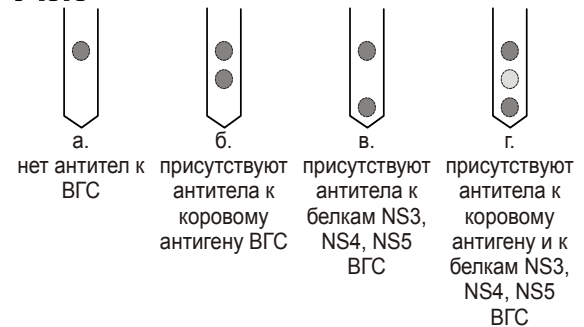


Рис. 6. Результаты анализа

1. Появление на зубце тестируемого образца только **верхней** точки (внутренний контроль) указывает на то, что исследуемый образец **не содержит** антител к ВГС (Рис. 6а).
2. Появление на зубце тестируемого образца даже очень слабо окрашенных обеих – **средней** (Core) и **нижней** (NS3, NS4, NS5) точек указывает на **присутствие** антител к ВГС (положителен по ВГС) (Рис. 6г).
3. Появление на зубце тестируемого образца только **очень** слабой точки только на месте **средней** (Core) точки может соответствовать неспецифической реакции или очень ранней ВГС-инфекции и образец следует протестировать повторно (Рис. 6б).
4. Появление на зубце тестируемого образца только очень слабой точки только на месте **нижней** (NS3, NS4, NS5) точки может указывать на присутствие антител к ВГС, и образец следует протестировать повторно (Рис. 6в).

Внимание!

Любая слабо окрашенная нижняя точка (NS) зубцов должна рассматриваться как возможное наличие положительной реакции и подвергаться дальнейшим исследованиям. Любая слабо окрашенная средняя точка (коровий антиген) должна рассматриваться как возможный отрицательный результат. Рекомендуется перепроверять полученный результат.

Документация результатов

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

Ограничения

Тест-система «ИммуноКомб® II HCV» предназначена для скрининга. Присутствие антител к ВГС в исследуемых образцах должно быть подтверждено в подтверждающих тестах. Отрицательная серологическая реакция может наблюдаться в течение начального периода инфекции, так как для иммунного ответа

(образование антител) требуется некоторое время. Как и при использовании других тестов для *in vitro* диагностики, результаты данного теста должны рассматриваться совместно со всеми симптомами, клинической историей и другими лабораторными анализами каждого пациента.

Может наблюдаться перекрестная реактивность с ревматоидным фактором.

Показатели качества теста:

A. Специфичность тест-системы «ИммуноКомб® II HCV» была оценена на 1398 образцах, результаты приведены в таблице:

Тип образца	Количество образцов	Специфичность
Беременные женщины	162	100%
Госпитализированные пациенты	224	99,5%
Доноры крови	1012	99,01%

B. Чувствительность тест-системы «ИммуноКомб® II HCV» была оценена на 397 образцах сыворотки различных генотипов от пациентов с хроническим гепатитом С. В качестве референс-метода использовали ELISA тест-системы третьего поколения и ПЦР. Результаты приведены в таблице:

Количество образцов	Генотип	Чувствительность
224	1	100%
33	2	100%
88	3a	100%
1	3a+4c/4d	100%
40	4	100%
11	5a	100%

Чувствительность — 100 %

C. Способность тест-системы «ИммуноКомб® II HCV» выявлять сероконверсионные образцы была изучена на 24 сероконверсионных панелях. Результаты показали, что тест-системы «ИммуноКомб® II HCV» выявили более 50% ранних сероконверсионных образцов, одновременно с наиболее чувствительными ELISA-тестами.

D. Показатели качества тест-систем «ИммуноКомб® II HCV» были оценены на 1000 свежих образцах "того же дня" (≤ 1 дня после забора образца). В качестве референс-метода были использованы планшетные ИФА (ELISA) тест-системы 3 поколения и иммуноблот.

		Референс-Метод		
		Отрицательный	Положительный	Итого
«ИммуноКомб® II HCV»	Отрицательный	795	0	795
	Положительный	5	200	205
	Итого	800	200	1000

- Чувствительность «ИммуноКомб® II HCV» — 100%, специфичность — 99.4%

Повторяемость

Одна положительная сыворотка крови, была исследована в 12 повторах на 10 Гребнях, результаты учитывали визуально. Все результаты были интерпретированы как положительные.

Воспроизводимость

3 положительные сыворотки крови, были исследованы 10 наборами различных серий, результаты учитывали визуально. Все результаты были интерпретированы как положительные.

Перекрёстные реакции

Перекрёстные реакции с образцами положительными по ВГА (HAV), ВГВ (HBV), ВГД (HDV), Цитомегаловирусу, HSV I&II, EBV и Токсоплазме практически отсутствовали.

Перекрёстные реакции с образцами от пациентов с аутоиммун-

ными заболеваниями, включая ANA, также практически отсутствовали.

Интерференция

Не было замечено интерференции с гемолитическими образцами (гемоглобин до 10 мг/мл), образцами с липемией (холестерин до 281.6 мг/дл; триглицериды до 381.0 мг/дл) и с высоким билирубином (до 20 мг/дл).

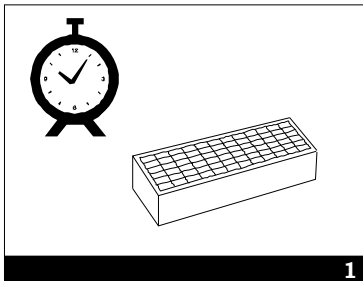
Условные Обозначения

	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контроль
	Отрицательный Контроль
	Перфоратор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание! Ознакомьтесь с сопровождающими документами
	Изделие медицинского назначения для диагностики in-vitro
	Температурные ограничения
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
	Уполномоченный представитель в ЕС
	Каталожный номер
	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
	Серийный номер

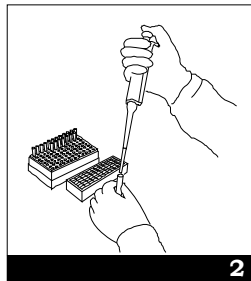
Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»
 Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
 тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

inverness medical innovations

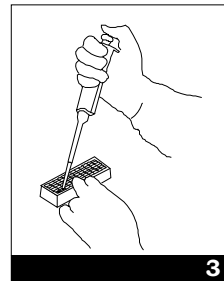
 Orgenics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 ©2009 Inverness Medical. All rights reserved	 MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22 Version: 60455002/R6/OR/CE (02/2011)
---	---



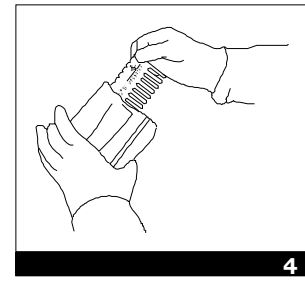
1 Подготовка Проявочной ванны: инкубировать 3 часа при комнатной температуре или 20 минут при 37°C.



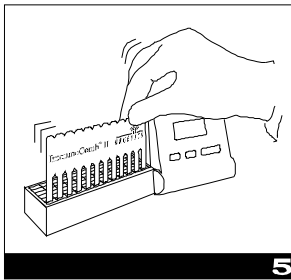
2 Аккуратно встряхнуть Проявочную ванну. Забор образцов и контролей.



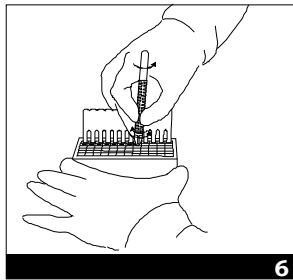
3 Внести образцы и контроли в ячейки ряда А. Перемешать.



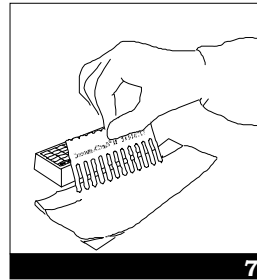
4 Извлечь Гребень из упаковки.



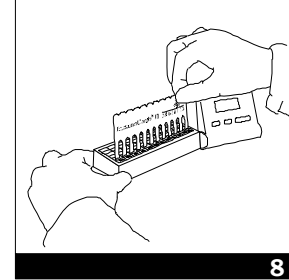
5 Вставить Гребень в ячейки ряда А и перемешать. Инкубировать.



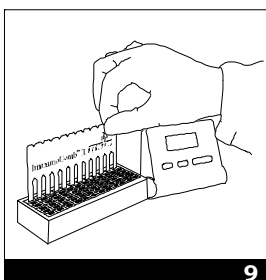
6 Перфоратором проколоть фольгу ячеек ряда В.



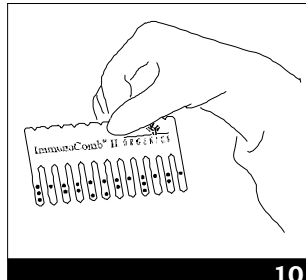
7 Удалить капли жидкости с концов Гребня.



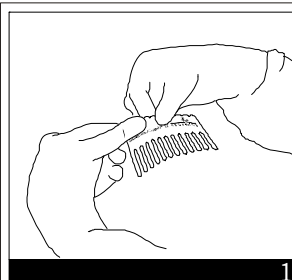
8 Гребень вставить в ячейки ряда В и перемешать. Инкубировать.



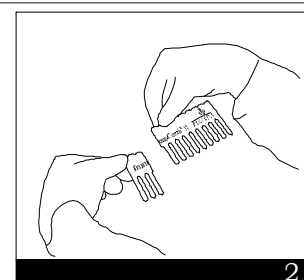
9 Цветная реакция в ряду F после перемешивания и инкубации в рядах С, D и E.



10 Результат в виде окрашенных точек.



11 Для индивидуального тестирования: согнуть гребень по вертикали, аккуратно сломать или отрезать ножницами требуемое число зубцов.



Краткое Описание Процедуры Анализа

Эта краткая инструкция предназначена для лиц, имеющих опыт использования тест-систем «ИммуноКомб® II HCV».

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов. Проводить анализ при комнатной температуре (22-26°C).
2. Внести по 50 мкл каждого исследуемого образца и контроля в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешать.
3. Вставить Гребень в ряд А и следовать указаниям таблицы:
4. Во время инкубации в рядах А и С время от времени перемешивать, вынимая и вставляя гребень.

Стадия	Ряд	Порядок действий
Реакция антиген-антитело	А	Перемешайте, инкубация 10 мин, удалите капли
Промывание	В	Прополоскайте, инкубация 2 мин, удалите капли
Реакция с конъюгатом	С	Перемешайте, инкубация 10 мин, удалите капли
Промывание	D	Прополоскайте, инкубация 2 мин, удалите капли
Промывание	E	Прополоскайте, инкубация 2 мин, удалите капли
Окрашивание	F	Перемешайте, инкубация 10 мин
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин, сушка на воздухе