



ImmunoComb® II

Rubella IgG



Code: 60400002

0459
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® II Rubella IgG» - это быстрый тест для количественного определения IgG антител к вирусу Краснухи (Rubella) в сыворотке или плазме человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Вирус Rubella принадлежит семейству вирусов *Togaviridae* и обнаруживается в основном в человеческих популяциях. Передается воздушно-капельным путём или при непосредственном контакте, наибольшая частота заболеваний в возрастной группе от 5 до 14 лет. Инфицирование в большей части случаев проявляется в виде легкого, не требующего лечения заболевания, с характерной сыпью, небольшим повышением температуры и лимфоденопатией. Иногда сопровождается скоротечными артралгиями и артритами.

В отличие от вышесказанного, первичное заражение на ранних стадиях беременности может нанести серьёзные повреждения плоду, не исключая фатальный исход и выкидыш. Симптомы врожденной инфицированности младенцев включают серьезные анатомические и нейросенсорные отклонения, такие как глухота, сердечные дефекты, катаракта, глаукома и умственная отсталость. Задержку роста и сахарный диабет также связывают с поздними осложнениями внутриутробной Краснухи.

Получившая широкое распространение вакцинация существенно уменьшила заболеваемость Краснухой во всех возрастных группах. Тем не менее, от 10 до 20% молодых взрослых восприимчивы к данному вирусу.

Скрининг на IgG антитела к вирусу Краснухи помогает в диагностике данного заболевания и в определении иммунного статуса. Антитела к данному вирусу появляются, когда исчезает сыпь. В организме взрослого человека IgG антитела

обычно сохраняются на протяжении всей жизни. Поэтому постоянный титр IgG антител к вирусу Краснухи указывает на заболевание, перенесенное в прошлом, в то время как четырехкратное и большее увеличение титра свидетельствует о недавнем заражении.

Тем не менее, повышенный титр IgG антител к вирусу Краснухи в отсутствие каких-либо клинических симптомов может также указывать на повторное инфицирование. Так как IgM антитела не вырабатываются при повторном инфицировании, недавнее заражение вирусом Краснухи следует исключить, получив отрицательный результат теста на IgM антитела к вирусу Краснухи.

Образование циркулирующих IgG антител у внутриутробно инфицированных младенцев обычно продолжается до 3-4 лет после рождения. Поэтому последовательное измерение уровня IgG антител у младенца помогает отличать внутриутробную Краснуху (постоянный уровень) от послеродовой Краснухи (увеличение титра).

Принцип анализа

В наборе ImmunoComb® II Rubella IgG используется метод непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твёрдой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами). Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах:

верхняя точка – иммуноглобулинами человека (Внутренний Контроль)

нижняя точка – инактивированными антигенами вируса Краснухи.

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 следует развести в соотношении 1:11 и добавить к растворителю в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляется Гребень. Антитела к вирусу Краснухи, если они присутствуют в образце, специфично связываются с антигенами вируса Краснухи на нижней точке зубцов Гребня (Рис. 1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С IgG антитела к вирусу Краснухи, захваченные на нижних точках зубцов Гребня, и иммуноглобулины человека на верхних точках (Внутренний Контроль) связываются с антителами к IgG человека, мечеными щелочной фосфатазой (AP). В следующих двух рядах несвязанные компоненты удаляются промывкой. В ряду F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенными компонентами. Результаты реакции наблюдаются визуально в виде серо-синих точек на поверхности зубцов Гребня.

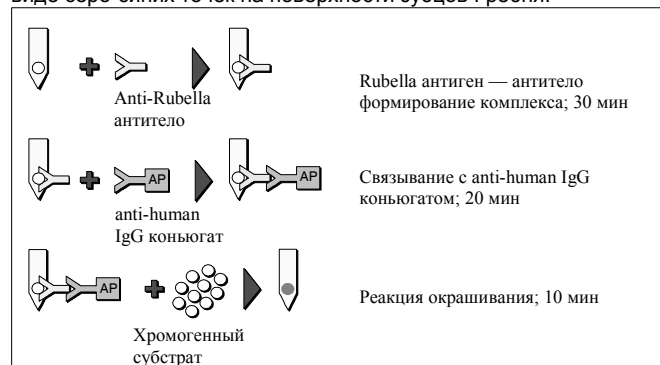


Рис. 1. Метод тестирования

В набор входят Положительный Контроль, содержащий IgG антитела к вирусу Краснухи и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов для подтверждения достоверности анализа. По завершению анализа, на зубце с Положительным Контролем должны быть две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна появиться верхняя точка, нижняя точка либо отсутствует, либо слабоокрашена. Верхняя точка должна появиться на всех остальных зубцах, подтверждая, что тест-система не была повреждена во время хранения и транспортировки и анализ проведен правильно.

Состав набора

Гребни

Набор содержит 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 – иммуноглобулинами человека (Внутренний Контроль)

нижняя точка – инактивированными антигенами вируса Краснухи.

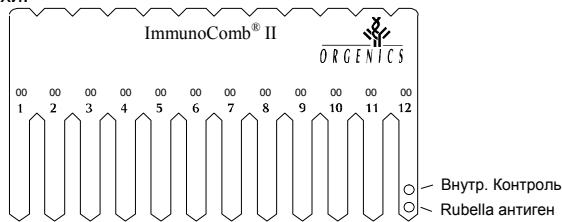


Рис.2. Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках с влагопоглостителем.

Проявочные ванны

В набор входят 3 Проявочные ванны. Каждая ванна (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	растворитель пробы
Ряд В	промывочный раствор	промывочный раствор
Ряд С	козьи антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой (AP-конъюгат)	Goat anti-human IgG 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-бром-4-хлор-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)	раствор окрашивающего вещества, содержащий 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат (BCIP) и нитросиний тетразол (NBT)

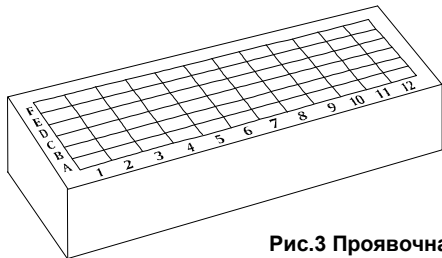


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль — 1 флакон (красная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, разведенной до учетного уровня 15 МЕ/мл (IU/ml) IgG антител к вирусу Краснухи.

Отрицательный Контроль — 1 флакон (зелёная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, отрицательной по антителам к вирусу Краснухи.

Разбавитель образца — 1 флакон 5 мл.

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

Шкала CombScale™ — для считывания результатов теста.

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

- 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, разбавитель образца) в помещение с комнатной температурой.
- Застелите рабочий стол фильтровальной бумагой, которая после окончания работы должна быть уничтожена как биологически опасные отходы.
- 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.

- Разорвите алюминиевую упаковку с Гребнем вдоль надсечённого края. Извлеките Гребень.
- Можно использовать Гребень и Проявочную ванну целиком, либо только их часть. Для использования части Гребня:

* За исключением хранения для документации

- Определите количество зубцов, необходимое для анализа образцов и контролей. На каждый тест требуется по одному зубцу. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "00" 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.

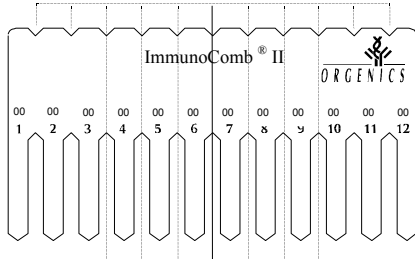


Рис. 4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Предварительная обработка образцов и контролей.

- Для каждого образца и контроля введите по 100 мкл разбавителя образца в микропробирку или лунку микротитратора.
- В каждую микропробирку или лунку добавьте 10 мкл образца или контроля. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А)

- Наберите в пипетку 25 мкл предварительно разведенного образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором фольгу в одной из лунок ряда А Проявочной ванны и введите образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
- Повторите этап 3 для других предварительно разведенных образцов и контролей. Используйте новую лунку из ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца и контроля.

- Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание:** Вставляйте и вынимайте Гребень в лунки (несколько раз).
- Оставьте Гребень в лунках ряда А и выдержите ровно 30 минут. Включите таймер. За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
- По истечении 30 минут извлеките Гребень из ряда А. **Удалите оставшиеся капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня** фильтровальной бумагой. Не касайтесь передней части поверхности зубцов.

Первая промывка (Ряд В).

- 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 5с

Связывание с Конъюгатом (Ряд С).

- Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Помешайте** как на этапе 5а. 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 6. 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 Проявочная ванна

Неиспользованные лунки Проявочной ванны можете хранить для дальнейшего исследования следующим образом:

- заклейте использованные лунки широкой лентой во избежание пролития, в случае опрокидывания Проявочной ванны.

Другие материалы набора

- Верните оставшиеся Проявочные ванны, Гребни, перфоратор, контроли, разбавитель образца и инструкцию обратно в оригинальную упаковку набора. 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. Подтверждение достоверности теста

Считывание и интерпретация результатов

Скрининг

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

- Точка с интенсивностью окрашивания **большей или равной** интенсивности окраски точки Положительного Контроля указывает на **присутствие** антител IgG к вирусу Краснухи.
- Отсутствие точки, или точка с интенсивностью окрашивания **меньшей**, чем у Положительного Контроля рассматривается как **отрицательный** результат.



Количественная визуальная интерпретация результатов.

Уровень IgG антител к вирусу Краснухи в каждом образце можно определить, сравнивая интенсивность окраски **нижней точки** каждого зубца с цветовой шкалой CombScale, входящей в состав набора, следующим образом (Рис. 7):

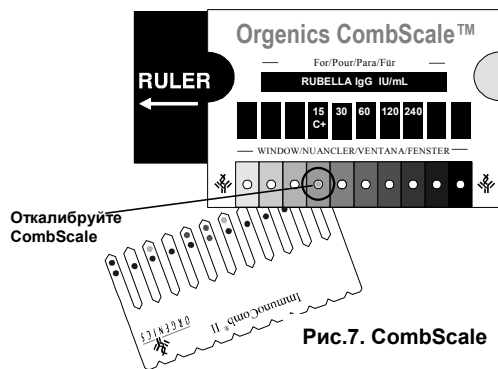


Рис.7. CombScale

1. Откалибруйте CombScale для оценки уровня IgG антител к вирусу Краснухи. Поместите **нижнюю** точку на зубце с **Положительным Контролем** под наиболее подходящий по интенсивности окраски участок на шкале. Сдвиньте линейку (RULER) так, чтобы надпись "15; C+" появилась в окошечке над участком шкалы с выбранной окраской.
2. Считывайте результаты, **не меняя калибровочного положения линейки**. Для каждой нижней точки исследуемых образцов подберите участок шкалы наиболее близкий по интенсивности окраски. Запишите число в окошке над этим участком как концентрацию в МЕ/мл (IU/ml)* IgG антител к вирусу Краснухи этом образце.

* Соответствует первому стандарту ВОЗ антител к вирусу Краснухи, код RUBI-1-94

Документация результатов

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

Ограничения

Также как и в случае с другими тестами, предназначенными для диагностики *in vitro*, результаты этого теста должны рассматриваться в совокупности со всеми симптомами, клинической историей болезни и другими лабораторными исследованиями пациента.

Показатели качества теста*

Чувствительность и специфичность тест-системы ImmunoComb® II Rubella IgG были проверены на 223 образцах, полученные результаты были сравнены с разными анализами ELISA, с пороговым значением концентрации 15 МЕ/мл (IU/ml). Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты испытаний

Контрольный метод	ImmunoComb® II Rubella IgG	
	положительная	отрицательная
Реакция		
положительная	126	0
отрицательная	0	97

Исходя из полученных результатов были выявлены следующие показатели качества:

- Чувствительность - 100%
- Специфичность - 100%

Повторяемость

Произвольно было выбрано 10 Гребней из разных наборов одной серии. Одна положительная сыворотка была проверена 12 раз на каждом из выбранных Гребней. На всех Гребнях наблюдалась одинаковая концентрация IgG антител к вирусу Краснухи.

Воспроизводимость

3 образца было проверено на Гребнях 3 различных серий. Каждый образец был протестирован несколько раз. Во всех случаях были получены одинаковые концентрации IgG антител к вирусу Краснухи.

Перекрыстные реакции

Перекрыстные реакции для образцов положительных по Тохорасма и CMV были незначительными.

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 повышенным уровнем билирубина (до 20 мг/дл).

Библиография

1. Chernesky MA, Mahony JB. 1991. Rubella Virus. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds.

Manual of Clinical Microbiology, Fifth edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 918-923.

2. Enders G. 1984. Problems of Rubella diagnosis by various IgM techniques and the need for test combinations. In: Habermehl K-O, ed. Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Springer Verlag, Berlin, pp. 146-161.
3. Evans AS, Brachman JS, eds. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. 3rd edition. New York, NY: Plenum Medical Book Company, 1998.
4. Frenkel LM, Nielsen K, Garakian A, et al. A search for persistent rubella virus infection in persons with chronic symptoms after rubella and rubella immunization and in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Infect Dis* 1996; 22:287-94.

* Подробные данные предоставляются по требованию.

5. Mellinger AK, Cragan JD, Atkinson WL, et al. High incidence of congenital rubella syndrome after a rubella outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:573-8.

Условные обозначения

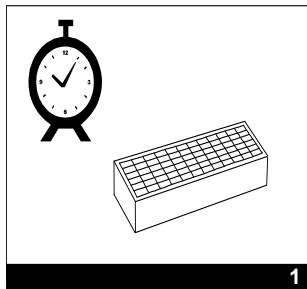
CARD	Гребень
PLATE	Проявочная ванна
CONTROL +	Положительный Контроль
CONTROL -	Отрицательный Контроль
PERFORATOR	Перфоратор
DIL	Разбавитель образца
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы.
IVD	Изделие медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
	Ограничения температуры
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
EC REP	Уполномоченный представитель в ЕС
COMBSCALE	Шкала CombScale™
REF	Каталожный номер
LOT	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
SN	Серийный номер

Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»

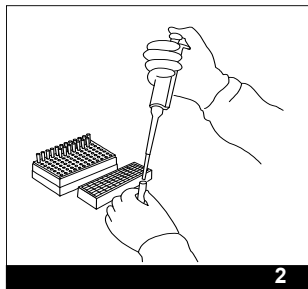
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
 тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

<p>Organics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58</p>	<p>EC REP</p> <p>MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22</p> <p>Version: 6040002/R5/OR/CE (03/2009)</p>
<p>©2008 Inverness Medical. All rights reserved</p>	

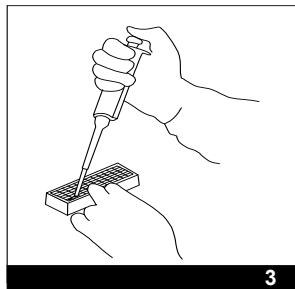
Описание основных этапов анализа



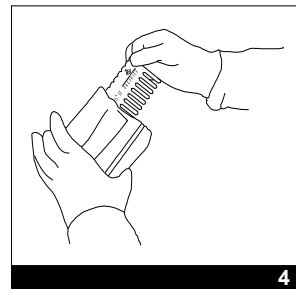
1
Подготовка Промывочной ванны: инкубация 3 часа при комнатной температуре или 20 минут при 37°C



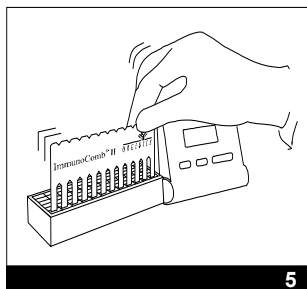
2
Забор и предварительное разведение образцов и контролей.



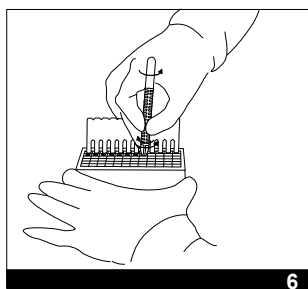
3
Добавление предварительно разведенных образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание



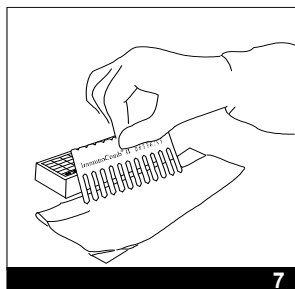
4
Извлечение Гребня из упаковки.



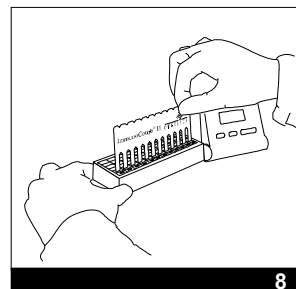
5
Введение Гребня в лунки ряда А и перемешивание. Инкубация.



6
Вскрытие лунок ряда В Перфоратором.

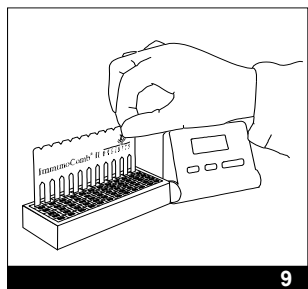


7
Удаление оставшихся капель жидкости с заостренных концов зубцов Гребня.

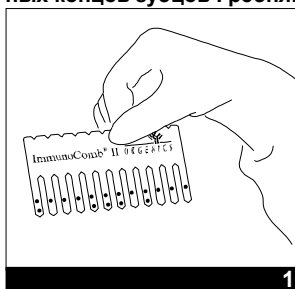


8
Введение Гребня в лунки ряда В. Перемешивание, инкубация.

После смешивания / взбалтывания и инкубации в рядах С, D и E ...



9
Цветная реакция в ряду F



10
Результаты

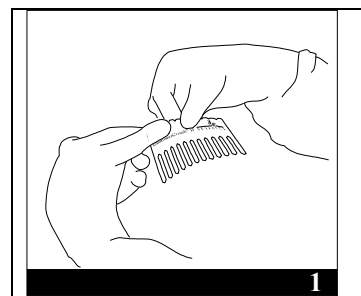
Краткое руководство по проведению анализов

Прилагаемая краткая инструкция предназначена для опытных пользователей набора ImmunoComb® II Rubella IgG. (Полная инструкция приведена выше.)

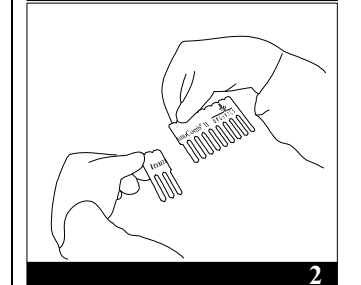
1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов, довести все необходимые компоненты набора до комнатной температуры. Проводить анализ при комнатной температуре (22-26°C).
2. Разведите по 10 мкл каждого образца и контроля 100 мкл разбавителя образцов.
3. Внесите 25 мкл каждого разведенного образца и контроля в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
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	А	Перемешайте; инкубация 30 мин. ; удалите капли.
Промывка	В	Прополощите; инкубация 2 мин. ; удалите капли.
Связывание с Конъюгатом	С	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.



1



2

Сгибание и разделение Гребня