

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест – системы иммуноферментной для дифференцированного выявления IgM и IgG антител к антигенам вируса Денге

«ИммуноКомб[®] II лихорадка Денге IgM и IgG БиСпот»

(ImmunoComb[®] II Dengue IgM&IgG BiSpot)

Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00770 от 17 декабря 2007 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Только для in vitro диагностики

ИФА тест-система «ИммуноКомб[®] II лихорадка Денге IgM и IgG БиСпот» предназначена для количественного определения антител к вирусу Dengue с дифференциацией антител по классу IgG и IgM. Один комплект рассчитан на проведение 36 анализов, включая контроли: положительный (K⁺) и отрицательный (K⁻).

СОСТАВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

ИФА тест-система «ИммуноКомб[®] II лихорадка Денге IgM и IgG БиСпот» (Быстрый Простой Тест) представляет собой набор компонентов для дифференцированного (индивидуального) количественного определения антител к вирусу Dengue с дифференциацией антител по классу IgG и IgM. Выпускается в виде комплекта, рассчитанного на проведение от 1 до 36 анализов одновременно. В состав комплекта входит:

1. **Положительный контрольный образец K⁺** (красная крышка) – разведённая плазма крови человека, содержащая IgG и IgM антитела к вирусу Денге, инактивированная β-пропиолактоном и прогреванием при 56 °С в течение 30 минут, жидкая — 0,15 мл, 1 флакон;

2. **Отрицательный контрольный образец K⁻** (зеленая крышка) — разведённая реконструированная плазма крови человека, не содержащая антител к вирусу Денге 2, инактивированная β-пропиолактоном и прогреванием при 56 °С в течение 30 минут, жидкая — 0,15мл, 1 флакон;

3. **Гребень** пластиковый (Рис.1), содержащий 12 зубцов (по зубцу на каждый тест), в упаковке из алюминиевой фольги с пакетиком влагопоглотителя – 3 шт.

На активированную поверхность каждого зубца нанесены:

верхняя точка (1) - биотинилированный бычий сывороточный альбумин (БСА) (внутренний контроль),

средняя точка (2) - козы антитела к IgG человека ,

нижняя точка (3) - козы антитела к IgM человека

4. **Проявочная ванна** (Рис.2), содержащая все реагенты, необходимые для проведения анализа - 3 шт. Поверхность Проявочной ванны запечатана алюминиевой фольгой. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (А - F) по 12 ячеек в каждом. Содержимое каждого ряда:

Ряд А: разбавитель образца

Ряд В: антигены Dengue

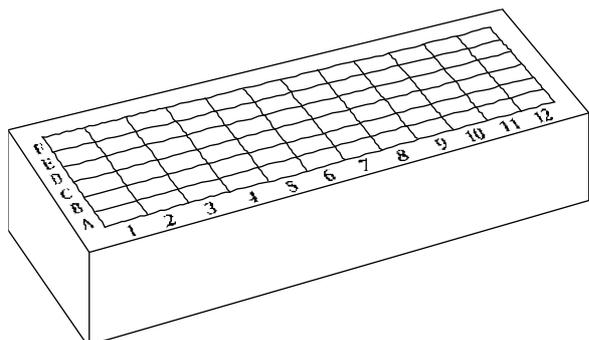
Ряд С: биотинилированные моноклональные антитела к протеинам Dengue

Ряд D: конъюгат стрептавидина с щелочной фосфатазой

Ряд Е: промывочный раствор

Ряд F: раствор хромогенного субстрата (окрашивающего вещества), содержащий 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)

Рисунок: Проявочная ванна



5. **Перфоратор** для прокалывания фольги, покрывающей ячейки проявочной ванны - 1 шт.

6. **CombScale™** - шкала для считывания результатов анализа.

7. Инструкция по применению.

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:

- работать в лабораторной одежде, используя резиновые перчатки;
- не всасывать растворы в пипетку ртом;
- все отработанные материалы подвергать обработке 6% раствором перекиси водорода либо аналогичным дезраствором не менее 2-х часов. Твердые отходы автоклавировать;
- не смешивать реагенты из наборов разных серий;
- не использовать набор после срока годности;
- после первого вскрытия Гребня и Проявочной ванны использовать их не более 3-х раз.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа используют плазму или сыворотку крови человека. Исследуемые образцы сывороток или плазмы хранить не более 7 дней при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить и хранить при температуре минус 20°C и ниже. После оттаивания образцы осветляют центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут.

Повторное замораживание образца не рекомендуется.

Антикоагулянты такие, как гепарин, EDTA, цитрат натрия не влияют на результаты анализа.

При экстренных анализах можно использовать цельную кровь (венозную, пальцевую), в количестве в 2 раза превышающем количество сыворотки или плазмы, указанное в инструкции к набору.

ПОДГОТОВКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Необходимое оборудование:

1. Автоматические пипетки - дозаторы со сменными наконечниками для объема 10 мкл.
2. Ножницы.
3. Лабораторный таймер или часы.

При проведении анализа используйте ингредиенты одного комплекта.

Все ингредиенты комплекта готовы к употреблению.

Исследование образцов следует проводить при температуре 22-26°C.

Перед проведением анализа все компоненты тест-системы и образцы перенести в помещение с комнатной температурой 22-26°C.

Проявочную ванну следует выдержать при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре 22-26°C в течение 3 часов.

Осторожно вскрыть алюминиевую упаковку Гребня. Гребень достать из упаковки за верхнюю часть, ни в коем случае не прикасаясь руками к зубцам Гребня.

Для анализа 36 образцов сыворотки (плазмы) используют все Гребни и Проявочные ванны, входящие в набор.

При исследовании меньшего количества сывороток, следует подсчитать, сколько зубцов потребуется для анализа образцов и контролей. В соответствии с этим согнуть Гребень по вертикали, аккуратно сломать или отрезать ножницами требуемое число зубцов. Для идентификации типа набора на каждом зубце нанесен цифровой код «83».

Неиспользуемую часть Гребня поместить в его же алюминиевую упаковку (проследите наличие в ней пакетика влагопоглотителя). Плотно закрыть упаковку, например, канцелярской скрепкой, чтобы избежать проникновения влаги. Хранить Гребни в оригинальной коробке комплекта при температуре 2-8°C для дальнейшего использования в течение указанного срока годности.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследование образцов следует проводить при температуре 22-26°C.

1. Не прокалывая перфоратором фольгу Проявочной ванны, перемешать находящиеся в ней реагенты аккуратным встряхиванием и покачиванием. Вскрывают фольговое покрытие Проявочной ванны только в тот момент, когда это указано в инструкции.
2. Перфоратором проколоть фольговое покрытие ячейки ряда А. Автоматической пипеткой внести в открытую ячейку ряда А 10 мкл исследуемого образца, касаясь наконечником пипетки дна лунки.

Тщательно перемешать внесенный образец с содержимым ячейки, многократно (не менее 10 раз) набирая и выпуская раствор пипеткой. Сбросить наконечник.

3. Повторить п.2 для всех остальных образцов и контролей. Используйте новую ячейку ряда А и меняйте наконечник для каждого образца или контроля.
4. Гребень вставить в ячейки ряда А, держа за верхнюю часть, надписями к оператору. *Ни в коем случае не прикасайтесь к зубцам Гребня.* Перемешать раствор, аккуратно покачивая Гребень от себя, к себе и двигая Гребень вверх вниз, не вынимая из ячеек, а затем оставить Гребень в ячейках ряда А точно на 10 минут (**ряд А – захват антител**).
5. Перфоратором проколоть фольгу необходимого количества ячеек ряда В. Вынуть Гребень из ячеек ряда А. Удалить капли жидкости с концов Гребня, аккуратно прикасаясь концами зубцов к фильтровальной бумаге, лежащей на столе, держа Гребень строго вертикально за верхнюю часть.
6. Гребень вставить в ячейки ряда В. Перемешать раствор, как в п.4 и оставить Гребень в ряду В на 40 минут (**ряд В -реакция антиген-антитело**).
7. Перфоратором проколоть ячейки ряда С. Вынуть Гребень из ячеек ряда В, удалить с концов Гребня капли жидкости при помощи фильтровальной бумаги, как в п.5, вставить Гребень в ячейки ряда С. Перемешать раствор, как в п.4 и оставить Гребень в ряду С на 40 минут (**ряд С - связывание с биотинилированными моноклональными антителами к протеинам Dengue**).
8. Перфоратором проколоть ячейки ряда D и вставить Гребень, предварительно удалив капли жидкости с концов Гребня при помощи фильтровальной бумаги, как в п.5, вставить Гребень в ячейки ряда D. Перемешать раствор, как в п.4 и оставить Гребень в ряду D на 10 минут (**ряд D —связывание с конъюгатом**).
9. Перфоратором проколоть ячейки ряда E и вставить Гребень, предварительно удалив капли жидкости. Промыть, как в п.4 —в течение 2 минут (**ряд E - первое промывание**).
10. Перфоратором проколоть ячейки ряда F и вставить Гребень, предварительно удалив капли жидкости. Перемешать раствор, как в п.4 и оставить Гребень в ряду F на 10 минут (**ряд F - цветная реакция**).
11. Вернуть Гребень в ячейки ряда E на 1 минуту, предварительно удалив капли жидкости (**ряд E - остановка реакции**).
12. Вынуть Гребень из Проявочной ванны, подсушить его на воздухе в течение 2 минут.

Удаление отходов.

Использованные Проявочные ванны, наконечники пипеток, фильтровальная бумага и перчатки должны уничтожаться, как биологически опасные отходы.

ХРАНЕНИЕ НЕИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЧАСТЕЙ НАБОРА

Если не использованы все ячейки Проявочной ванны, ее следует сохранить для последующих анализов, заклеив отработанные ячейки клейкой лентой.

Неиспользованную часть Гребня следует поместить в свою же алюминиевую упаковку (проследите наличие в ней пакетика влагопоглотителя). Плотно закрыть упаковку, например, канцелярской скрепкой, чтобы избежать проникновения влаги. Хранить Гребни в оригинальной коробке комплекта при температуре 2-8° С для дальнейшего использования в течение срока годности.

Оставшиеся неиспользованными Проявочные ванны, Гребни, перфоратор, контрольные образцы, инструкцию по применению следует упаковать в коробку комплекта и хранить при температуре 2-8°С.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа можно учитывать, если:

- при анализе положительного контрольного образца (**К+**) проявились **3 точки**;
- при анализе отрицательного контрольного образца (**К-**) проявилась **верхняя точка** (внутренний контроль) и никаких других точек;
- у каждого **исследуемого образца** проявилась **верхняя точка** (внутренний контроль). Это также подтверждает, что образец был внесен.

Если хотя бы одно из этих условий не выполнено, то результаты анализа недостоверны и его следует повторить.



Результат учитывают независимо от степени окраски точек (интенсивность окраски точки внутреннего контроля может различаться в зависимости от образца).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ВИЗУАЛЬНОМ УЧЕТЕ

Интерпретация Dengue IgM (нижняя точка) при визуальном учете

Сравните интенсивность окрашивания нижней точки каждого образца с интенсивностью окрашивания нижней точки на зубце с положительным контролем.

1. Точка с интенсивностью окрашивания **большей или равной** интенсивности окраски точки положительного контроля указывает на **наличие IgM** антител к вирусу Dengue в исследуемом образце.
2. **Отсутствие точки** или точка с интенсивностью окрашивания **меньшей**, чем положительный контроль, указывает на **отсутствие IgM** антител к вирусу Dengue в исследуемом образце.
3. Образцы давшие **сомнительный** результат должны быть протестированы заново. Если повторное тестирование так же дало сомнительный результат, следует произвести забор нового образца.

Интерпретация Dengue IgG (средняя точка) при визуальном учете

Уровень IgG антител к вирусу Dengue в каждом из образцов можно оценить, сравнивая интенсивность окраски точки каждого зубца с цветовой шкалой CombScale, входящей в состав набора. Это делается следующим образом:

1. Откалибруйте КомбСкейл. Поместите **среднюю** точку **Положительного контроля** под участком шкалы с наиболее близкой интенсивностью окраски. Сдвиньте линейку-RULER так, чтобы надпись «С+» появилась в окошке над участком шкалы с выбранной интенсивностью окраски.
2. Считайте результаты, не меняя калибровочного положения линейки. Для каждого образца подберите участок шкалы наиболее близкий по интенсивности окраски к окраске **средней** точки на зубце.

Средняя точка с интенсивностью большей либо равной интенсивности цветовой шкалы под надписью «СО» в окне считается положительной на Dengue IgG.

В отсутствие IgM антител, средняя точка с интенсивностью выше «СО», но ниже чем «С+» считается отрицательной – нет признаков текущей инфекции Dengue IgG.

Средняя точка с интенсивностью близкой к или большей чем «С+» может использоваться как указание на вторичную инфекцию Dengue.

Показания по КомбСкейл:		Интерпретация
IgM	IgG	
<С+	<СО	Нет признаков Dengue инфекции
< С+	$СО \leq S^* < С+$	Нет признаков Dengue инфекции
$\geq С+$	< СО	Указывает на первичную Dengue инфекцию
$\geq С+$	$СО \leq S^* < С+$	Указывает на первичную Dengue инфекцию
< С+	$\geq С+$	Указывает на вторичную Dengue инфекцию
$\geq С+$	$\geq С+$	Указывает на вторичную Dengue инфекцию

ПРИБОРНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов может быть выполнен с помощью КомбСкан III™/CombScan III™ (см. инструкцию к прибору).

Система КомбСкан III™ использует принципиально новую функцию для обработки оптической плотности точек на сканируемых диагностических Гребнях, позволяющую количественно оценивать титр антител в крови. Прибор КомбСкан III™ адаптирован для российских пользователей. Хранит архив данных и позволяет выводить данные на экран и принтер.

Документирование результатов

Окраска проявленных точек стабильна, поэтому Гребни можно хранить в качестве документального подтверждения.

СРОК ГОДНОСТИ УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности - 9 месяцев.

Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре 2-8°C и относительной влажностью воздуха не более 70%.

Транспортирование осуществлять всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8°C. Возможно транспортирование в течение 3 – 5 суток при температуре не превышающей 26°C.

Не допускать замораживания. Внутренний контроль тест-системы подтверждает сохранность реагентов при транспортировке.

ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ТЕСТА

Чувствительность

Чувствительность была изучена на 365 положительных по Dengue, полученных из нескольких центров южной Америки и Филиппинов.

Следующие результаты были получены:

Чувствительность по IgG – 99,1%

Чувствительность по IgM- 97,5%

Специфичность

Специфичность теста изучалась на 669 образцах отрицательных по Dengue. Образцы были получены от доноров из регионов с как с высокой так и с низкой распространенностью Dengue, от беременных, от пациентов с неинфекционными заболеваниями (онкологическими, аутоиммунными), от пациентов с инфекционными заболеваниями, такими как ВИЧ, гепатиты В и С и с арбовирусами антигенной группы В (японский энцефалит, жёлтая лихорадка, лихорадка Западного Нила)

Следующие результаты были получены:

Общая специфичность 97,9

PPV (прогностическая ценность положительного результата):

для IgG – 91,4%

для IgM- 91,4%

NPV (прогностическая ценность отрицательного результата): PPV (прогностическая ценность положительного результата):

для IgG – 100%

для IgM- 96,8%

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Эта краткая инструкция предназначена для лиц, имеющих опыт использования комплектов «ИммуноКомб® II лихорадка Денге IgM и IgG БиСпот».

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.
2. Внести по 10 мкл каждого исследуемого и контрольных образцов в ячейки ряда А Проявочной ванны и перемешать.
3. Вставить гребень в ряд А и следовать указаниям таблицы:

Стадия	Ряд	Порядок действий
Захват антител	А	Перемешать, инкубировать 10 мин, промокнуть
Реакция антиген-антитело	В	Перемешать, инкубировать 40 мин, промокнуть
Связывание с биотинилированными козьими антителами к протеинам Dengue	С	Перемешать, инкубировать 40 мин, промокнуть
Реакция с конъюгатом	Д	Перемешать, инкубировать 10 мин, промокнуть
Промывание	Е	Перемешать в течение 2 мин, промокнуть
Окрашивание	Ф	Перемешать, инкубировать 10 мин
Остановка реакции	Е	Инкубировать 1 мин, высушить на воздухе

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

web: <http://www.biograd.ru>

e-mail: biograd@biograd.ru



Orgenics Ltd.,
P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel
Tel: + 972 8 942 92 01
Fax: + 972 8 943 87 58

MedNet GmbH
Borkstrasse 10
48163 Muenster - Germany
Tel: + 49 251 32266-0
Fax: + 49 251 32266-22

©2008 Inverness Medical. All rights reserved

Version: 60454002/R4/OR
(03/2009)