



# ImmunoComb® II

## HTLV I&II



Code: 60482002

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 HTLV I&II» - это быстрый тест для качественного определения IgG антител к HTLV I и HTLV II в сыворотке или плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

#### Введение

T-лимфотропные вирусы человека типа I (HTLV-I) и типа II (HTLV-II) являются ретровирусами типа C. HTLV-I в основном ассоциируется с двумя заболеваниями: лейкоемией/лимфомой (ATL) взрослых T-клеток и ассоциированной с HTLV-I миелопатией / тропическим спастическим парапарезом (HAM/TSP). HTLV-II не был этиологически связан с каким-либо заболеванием, хотя есть признаки его участия в некоторых гематологических и неврологических расстройствах.

У большинства инфицированных болезнь протекает бессимптомно и период до появления первых симптомов может длиться много лет. Заражение HTLV происходит по всему миру, однако известно, что HTLV-I высоко эндемичен в основном в Японии, на Карибах в Южной и Центральной Америке, Меланезии и экваториальной Африке. HTLV-II распространен среди людей, употребляющих наркотики внутривенно, в США и Европе и среди некоторых племен индейцев Северной, Южной и Центральной Америки. Заражение HTLV-I происходит через переливание крови, внутриутробно или при кормлении грудью. Заражение HTLV-II происходит так же как HTLV-I, а также через половой контакт и совместное использование зараженных игл и шприцов среди наркоманов, употребляющих наркотики внутривенно.

Вирус ассоциирован с клетками и, таким образом, заражение происходит после переливания клеточных компонентов крови. Заражение является пожизненным, поэтому как только у бессимптомного человека были обнаружены антитела к HTLV, он может быть заражен, и не может быть донором. Отсюда очевидна важность скрининга доноров на наличие HTLV.

Геном HTLV содержит четыре основных гена: gag, которые кодируют белки ядра (p19, p24); env, который ко-дирует

гликопротеины оболочки (gp21, gp46); pol, который кодирует обратную транскриптазу (96,000 дальтонов); и tax, который кодирует трансактиваторный белок в 40,000 дальтонов (p40x). Специфичное определение HTLV основано на белках оболочки и ядра (env и соge). Эти антигены могут использоваться в серологических диагностических тест-системах в трех формах: полного вирусного лизата, рекомбинантных или синтетических пептидов. Некоторые тесты используют различные комбинации этих форм. Алгоритм серологической диагностики HTLV состоит из скрининга, за которым следуют различные подтверждающие и дифференцирующие тесты. Только образцы, положительные при повторной постановке скринингового теста отправляются на подтверждающие процедуры. В то время как большинство скрининговых тестов являются ИФА, подтверждающие тесты являются иммуноблотами или основаны на радиоиммунопреципитационном анализе (РИПА).

#### Принцип анализа

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

**верхняя точка** – антителами к иммуноглобулину человека (Внутренний Контроль)

**нижняя точка** - рекомбинантными антигенами HTLV I&II.

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 предварительно добавляются в лунки ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляется Гребень. Антитела к HTLV, если они присутствуют в образце, специфически связываются с рекомбинантными антигенами на нижних точках зубца Гребня (Рис. 1). Одновременно, иммуноглобулины, присутствующие в образце, будут захвачены антителами к иммуноглобулину человека на верхней точке (Внутренний Контроль). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С специфические иммуноглобулины, захваченные на зубцах, реагируют с антителами к IgG человека, меченными щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase AP). В следующих двух рядах не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В ряду F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенными компонентами. Результаты реакции наблюдаются визуально в виде серо-синих точек на зубцах Гребня.

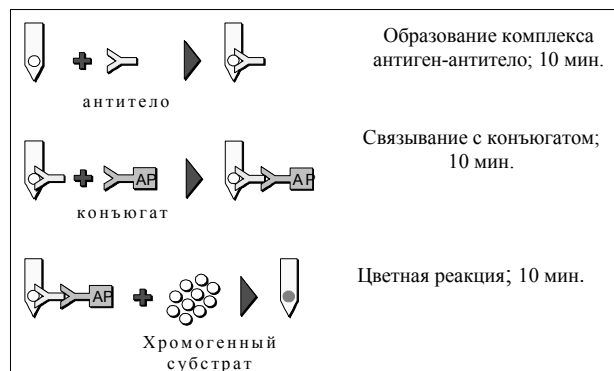


Рис. 1. Принцип анализа

В набор входит Положительный Контроль, содержащий антитела HTLV I и II и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов. При завершении анализа на зубце с Положительным Контролем должны появиться две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна появиться только верхняя точка. Верхняя точка также должна появиться на всех остальных зубцах, подтверждая, что набор работает правильно, образец был добавлен и тест выполнен корректно.

#### 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** – антителами к иммуноглобулину человека (Внутренний Контроль)

**нижняя точка** - рекомбинантными антигенами HTLV I&II

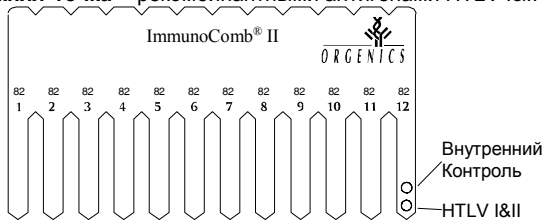


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках, которые содержат мешочек с влагопоглотителем.

### Проявочные ванны

В набор входят 3 Проявочные ванны, покрытые алюминиевой фольгой. Каждая Проявочная 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

Ряд В промывочный раствор

Ряд С козы антигела 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)

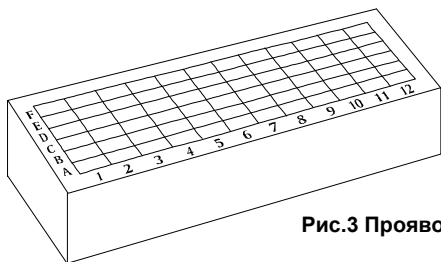


Рис.3 Проявочная ванна

**Положительный Контроль** - 1 флакон (красная крышка) 0.2 мл инактивированной разбавленной плазмы крови человека, положительной по антителам к HTLV I&II.

**Отрицательный Контроль** - 1 флакон (зелёная крышка) 0.2 мл разбавленной и инактивированной нагреванием, человеческой плазмы, отрицательной по антителам к HTLV I&II

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

### Меры Предосторожности

Обращайтесь с положительным контролем как с потенциально инфекционным материалом, хотя он и 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:

- 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 автоклавируют;
- 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.

### 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.
- 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. Вскрывают 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 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 кодировый номер набора "82" 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.

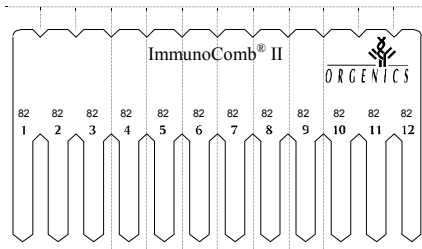


Рис. 4 Разделение Гребня

## Инструкция по проведению анализа

### Реакция Антиген-Антитело (Ряд А).

1. Наберите в пипетку 10 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 ровно 10 минут. Включите таймер. Дополнительно перемешайте два раза во время инкубации. 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 зубцов 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). В процессе инкубации перемешивайте 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. **Прополощите** несколько раз в течение 2 минут, как на этапе 4. 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. **Прополощите** несколько раз 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). В процессе инкубации перемешивайте как на этапе 3б. 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, контроли и инструкции обратно в оригинальную коробку набора. Храните при температуре 2–8°C.

## Результаты анализа

### Достоверность

Для подтверждения правильной работы набора и достоверности результатов анализа необходимо соблюдение трех условий (см. Рис. 5):

1. На зубце с **Положительным контролем** должны появиться две точки.
2. На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать только **верхняя** точка (Внутренний Контроль) и никаких других.
3. У каждой **тестируемого образца** должна появиться **верхняя** точка (Внутренний Контроль).

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



Рис. 5. Достоверность результата

### Интерпретация результатов

- Проявление на зубце тестируемого образца только **верхней точки** (Внутренний Контроль) указывает на то, что анализируемый образец **не содержит** антител к HTLV I&II (Рис. 6а).
- Появление на зубце тестируемого образца даже слабоокрашенной **нижней точки** указывает на **присутствие** антител к HTLV I&II (Рис. 6б).

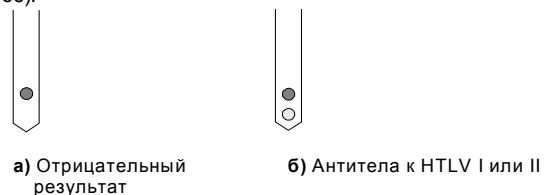


Рис.6. Результаты теста

### Документация результатов

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

### Ограничения

Как и в случае с другими тестами для диагностики in-vitro, результаты данного теста должны рассматриваться совместно со всеми симптомами, клинической историей и результатами других лабораторных анализов данного пациента.

### Показатели качества теста

#### КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические исследования, сделанные в Израиле, Колумбии и на Ямайке продемонстрировали высокие показатели чувствительности (100%) и специфичности (97%).

Были получены следующие результаты:

### Чувствительность тест-системы ImmunoComb® II HTLV I&II

Тип	Кол-во образцов	ImmunoComb® HTLV I&II	
		Отрицательный	Положительный
HTLV I	111	0	111
HTLV II	50	0	50
HTLV I&II (неизвестный тип)	93	0	93
<b>Итого</b>	<b>254</b>	<b>0</b>	<b>254</b>

### Специфичность тест-системы ImmunoComb® II HTLV I&II

Группа	Кол-во образцов	ImmunoComb® HTLV I&II		Specificity %
		Negative	Positive	
Здоровые доноры Область с низким распространением	100	98	2	98
Здоровые доноры Область с высоким распространением	102	102	-	100
Больные раковыми заболеваниями	206	195	11	94.6
Аутоиммунные болезни	15	15	-	100
Группа с высоким риском (Наркоманы и т.д.)	65	62	3	95.3
Другие инфекционные болезни (HIV, HAV, HBV, CMV, EBV)	36	36	-	100
HTLV- подозрительные с отрицательной серологией	13	13	-	100
<b>Итого</b>	<b>537</b>	<b>521</b>	<b>16</b>	<b>97</b>

#### Выводы

- ImmunoComb® II HTLV I&II обнаружил все тестируемые положительные образцы.
- Все образцы, которые были определены как отрицательные, были выявлены как отрицательные в ImmunoComb® II HTLV I&II.
- ImmunoComb® II HTLV I&II показал достоверные результаты как для HTLV- I, так и для HTLV- II.
- Результаты ImmunoComb® II HTLV I&II являются достоверными для образцов, содержащих потенциально кросс-реактивные антитела к ВИЧ и другим возбудителям, также как и при разных патологических состояниях.
- Надёжность ImmunoComb® II HTLV I&II была продемонстрирована как в районах с низким распространением заболевания, так и в районах с его высоким распространением, что подтверждает его пригодность для использования в любом регионе земного шара.

#### Библиография

- Gessain A, Mahieux R. 2000. A virus called HTLV-1. Virological and molecular aspects. Presse Med. 23;29(40):2228-32.
- Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC. . 2000. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. Braz J Med Biol Res; 33(12):1395-401.
- Courouce AM, Pilonel J, Saura C. 1999. Screening of blood donations for HTLV-I/II. Transfus Med Rev.; 13(4):267-74.
- Manns A, Hisada M, La Grenade L. 1999. Human T-lymphotropic virus type I infection. Lancet. 5; 353(9168):1951-8.
- Center for Control and Prevention and the USPHS Working Group. 1993. Guidelines for counseling persons with Human T-lymphotropic virus type I (HTLV I) and type II (HTLV II). Ann Intern Med. 118:448-454.
- Fischer H. E. 1994. Human T-lymphotropic Virus Types I and II: Screening and Seroprevalence in Blood Donors. Current Issues in Transfusion Medicine 3(4). October-December 1994.

### Условные обозначения

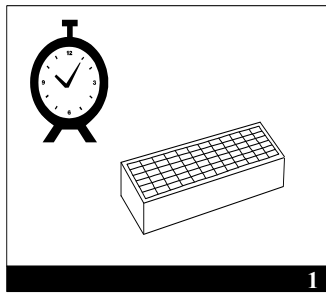
	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контрольный образец
	Отрицательный Контрольный образец
	Перфоратор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание! Ознакомьтесь с сопровождающими документами
	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Содержимого 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»

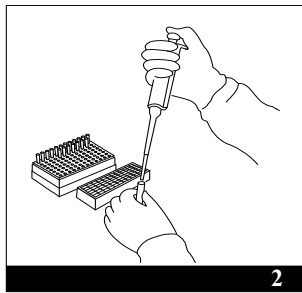
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.  
 тел/факс: +7 (812) 325 21 70  
<http://www.biograd.ru> [biograd@biograd.ru](mailto:biograd@biograd.ru)

inverness medical innovations							
Производитель:  Orgenics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 ©2008 Inverness Medical. All rights reserved	<table border="1"> <tr> <td>EC</td> <td>REP</td> </tr> <tr> <td colspan="2">MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>Version: 50410002/R4/OR/CE (03/2009)</b></td> </tr> </table>	EC	REP	MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22		<b>Version: 50410002/R4/OR/CE (03/2009)</b>	
EC	REP						
MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22							
<b>Version: 50410002/R4/OR/CE (03/2009)</b>							

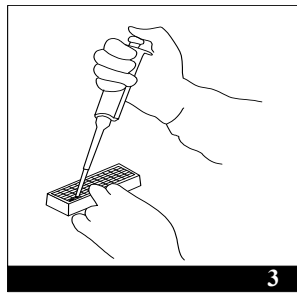
## Описание основных этапов анализа



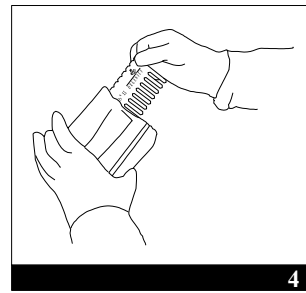
**1**  
Подготовка Проявочной ванны: инкубация 3 часа при комнатной температуре или 20 минут при 37 °С.



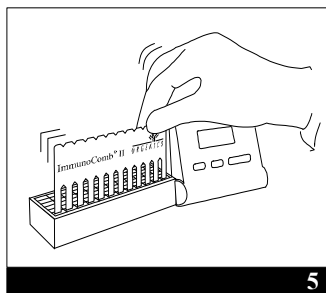
**2**  
Забор образцов и контролей



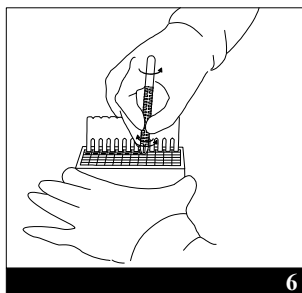
**3**  
Добавление образцов и контролей в лунки ряда А Проявочной ванны. Перемешивание



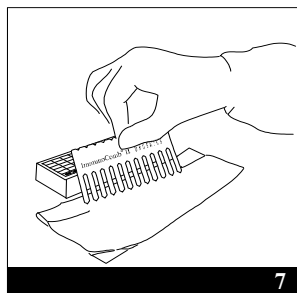
**4**  
Извлечение Гребня из упаковки



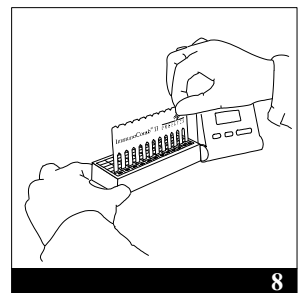
**5**  
Введение Гребня в лунки ряда А и перемешивание.



**6**  
Вскрытие лунок ряда В перфоратором

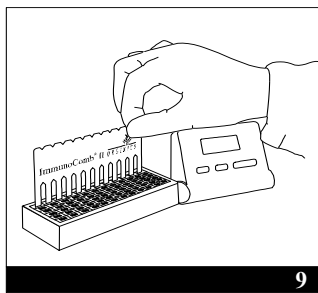


**7**  
Удаление капель жидкости с заостренных концов зубцов Гребня

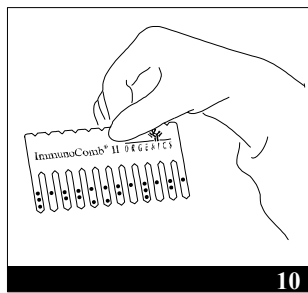


**8**  
Введение Гребня в лунки ряда В и промывание. Инкубация

После перемешивания / полоскания 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 HTLV I&II (Полная инструкция приведена выше).

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 30 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 лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
3. Вставьте Гребень в лунки ряда А и продолжайте в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1. Краткий процедурный перечень

Этап	Ряд	Действия
Реакция Антиген-Антитело	А	Перемешайте; инкубация 10 мин.; удалите капли.
Промывка	В	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли.
Связывание с Конъюгатом	С	Перемешайте; инкубация 10 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.