



ImmunoComb® II

HAV Ab

ORGENICS

CE

Code: 60456002

Format: 3 x 12 tests

Только для *in vitro* диагностики

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00770
от 17 декабря 2007 г.

Назначение

ИФА тест-система ИммуноКомб «ImmunoComb® II HAV Ab» – это тест для количественного определения антител к вирусу гепатита А (HAV) в сыворотке или плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Гепатит А, вызываемый вирусом гепатита А (ВГА, HAV), является широко распространенным в человеческой популяции заболеванием. По истечении длящегося от 14 до 40 дней инкубационного периода HAV инфекция обычно проявляет себя в виде желтухи, вызванной воспалением печени, с последующим повышением концентрации билирубина в крови. Случаев хронического заболевания не наблюдалось.

Гепатит А встречается по всему миру. Уровень местной санитарии и гигиены оказывает существенное влияние на его эпидемиологию. Передача инфекции осуществляется фекально-оральным путем. Большие количества вируса (до 108 инфекционных единиц на грамм) выделяется с фекалиями за несколько дней до появления клинических симптомов или желтухи. Дальнейшее распространение вируса происходит при непосредственных контактах или при употреблении загрязненной пищи или воды.

Успешная профилактика гепатита А в настоящее время осуществляется пассивной иммунизацией человеческими анти-HAV иммуноглобулинами. В дополнение недавно были разработаны вакцины против HAV.

Диагностировать HAV инфекцию только по клиническим признакам и биохимическим оценкам функционирования печени очень трудно, так как другие причины, среди которых вирусные агенты, такие как вирусы гепатита В и С, также приводят к гепатитам. Иммунодиагностика, тем не менее, позволяет идентифицировать этиологические агенты.

Тест HAV Ab позволяет определять иммунный статус человека после воздействия HAV или вакцинации против HAV. Выявление антител к HAV при отсутствии IgM антител к HAV свидетельствует либо о перенесенном ранее заболевании либо об успешной вакцинации. Считается что титр антител к HAV в 10 IU/L является минимальной концентрацией указывающей на иммунизацию пациента.

Принцип анализа

В тест-системе ImmunoComb® II HAV IgM используется метод иммунного захвата (модификация твердофазного иммуноферментного анализа - ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами).

Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах:

верхняя точка – моноклональными антителами к вирусу гепатита А (внутренний контроль);

нижняя точка – кроличьими антителами к IgG и IgM человека.

Проявочная ванна состоит из 6 рядов (А – F) по 12 лунок в каждом. Все ряды содержат готовые к использованию растворы реагентов для различных этапов анализа. Тест выполняется поэтапно, посредством перемещения Гребня из лунок одного ряда в лунки последующих рядов с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа образцы сыворотки или плазмы разводят в соотношении 1:50 и добавляют к разбавителю в лунки ряда А Проявочной ванны. Затем Гребень вводится в лунки ряда А. IgG и IgM человека захватываются IgG и IgM антителами, находящимися на нижних точках зубцов Гребня (Рис.1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С, IgG/IgM антитела, захваченные на зубцах Гребня, вступая в реакцию с антигеном HAV. В то же время, антиген HAV связывается с антителами к HAV на верхней точке (Внутренний контроль). В лунках ряда D связанный антиген HAV будет взаимодействовать с моноклональными антителами к HAV, мечеными щелочной фосфатазой (AP). В лунках ряда E несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. В лунках ряда F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенными компонентами. Результаты реакции наблюдаются визуально в виде серо-синих точек на поверхности зубцов Гребня.

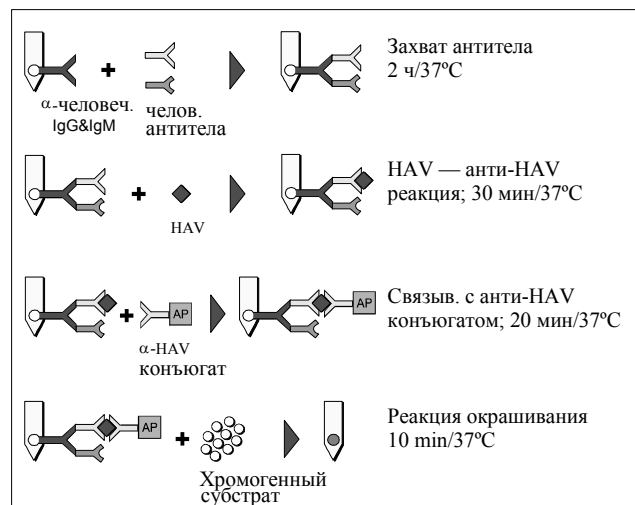


Рис. 1. Принцип анализа

В набор входит Положительный Контроль (содержащий антитела к HAV) 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, при этом 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

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

верхняя точка – моноклональными антителами к вирусу гепатита А (внутренний контроль);
нижняя точка – кроличьими антителами к IgG и IgM человека.

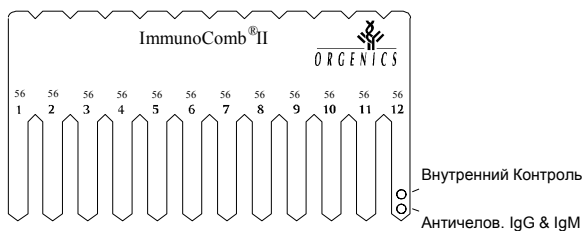


Рис.2. Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках, содержащих влагопоглотитель.

Проявочные ванны

В наборе 3 Проявочные 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	Растворитель образца
Ряд В	Промывочный раствор
Ряд С	Антиген HAV
Ряд D	Моноклональные антитела к HAV, меченные щелочной фосфатазой.
Ряд Е	Промывочный раствор
Ряд F	Раствор окрашивающего вещества, содержащий 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат (BCIP) и нитросиний тетразол (NBT)

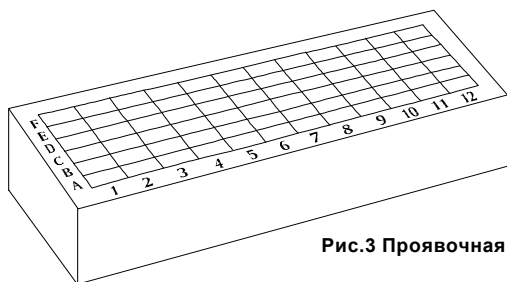


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль - 1 флакон (красная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, разбавленной до концентрации антител к HAV в 100 МЕ/л (IU/L).

Отрицательный Контроль - 1 флакон (зелёная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, не содержащей антител к HAV.

Растворитель Пробы - 1 флакон 20 мл раствора.

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

Шкала CombScale™ - для количественного считывания результатов тестов.

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.

* За исключением хранения для документации

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 490 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.
- Микропипетки

Подготовка к анализу

Доведите все компоненты, Гребни, реагенты и образцы до комнатной температуры (22-26°C), процедуру анализа проводите при 37°C.

Подготовка Проявочной ванны

1. Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 45 минут. Перенесите необходимые для проведения анализа компоненты набора (Гребень, образцы, контроли, очищающий раствор) 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. Вскрываете 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 пакет с Гребнем вдоль надсеченного края. Извлеките Гребень.
2. Гребень и Проявочную ванну можно использовать целиком или только их часть. Для использования части Гребня:
 - a. Определите количество зубцов, необходимых для тестирования образцов и контролей. Вам потребуется по одному зубцу на каждый анализ. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "56" для того, чтобы всегда можно было определить, к какому набору принадлежит отдельно взятый зубец.
 - b. Согните Гребень по вертикали, сломайте или отрежьте ножницами (см. Рис. 4) требуемое число зубцов.

- с. 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.

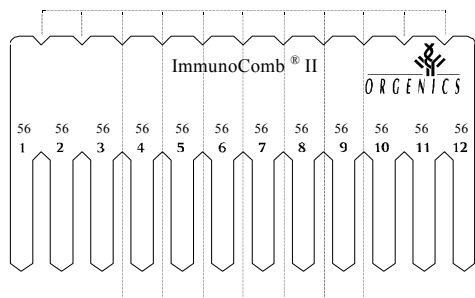


Рис. 4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Предварительная обработка образцов и контролей.

- Для каждого образца и контроля введите в микропробирку по 490 мкл разбавителя образца.
- В каждую микропробирку добавьте 10 мкл образца или контроля. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.

Захват Антител (Ряд А).

Примечание: Проводите **инкубацию** только при температуре **37°C!** Промывочные этапы проводите при комнатной температуре (22–26°C).

- 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 2 часа при температуре 37°C. Включите таймер. Во время инкубации дополнительно **перемешайте** три раза (каждые 30 минут). За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
- По истечении 2 часов извлеките Гребень из ряда А. **Удалите оставшиеся капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня** при помощи фильтровальной бумаги. Не касайтесь передней части поверхности зубцов.

Первая промывка (Ряд В).

- Вставьте Гребень в лунки ряда В. **Прополощите**, энергично вынимайте и вновь вставляйте Гребень в лунки на протяжении 10 секунд для более тщательной промывки. Повторите это действие несколько раз в течение 2 минут; тем временем, проколите фольгу лунок ряда С. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости** как на этапе 5с.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд С).

- Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Помешайте** как на этапе 5а. Выдержите Гребень в Проявочной ванне в течение 30 минут (включите таймер) при температуре 37 °С. Дополнительно **перемешайте** один раз во время инкубации. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 30 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Связывание с конъюгатом (Ряд D).

- Вставьте Гребень в лунки ряда D. **Перемешайте**. Выдержите Гребень в Проявочной ванне в течение 20 минут (включите таймер) при температуре 37 °С. Дополнительно **перемешайте** один раз во время инкубации. Проколите фольгу лунки ряда E. Через 20 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд E).

- Вставьте Гребень в лунки ряда E. **Прополощите** в течение 2 минут, как на этапе 6. 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**. Выдержите Гребень в Проявочной ванне в течение 10 минут (включите таймер) при температуре 37 °С. Дополнительно **перемешайте** один раз во время инкубации. Через 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд E).

- Снова вставьте Гребень в лунки ряда E. Через 1 минуту извлеките Гребень и просушите его на воздухе.

Хранение неиспользованных частей набора

Проявочная ванна

Неиспользованные лунки Проявочной ванны можно 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 инструкции 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, что 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

Считывание и интерпретация результатов

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

- Откалибруйте CombScale для оценки уровня антител к HAV. Поместите **нижнюю** точку на зубце с **Положительным Контролем** под наиболее подходящий по интенсивности окраски участок на шкале. Сдвиньте линейку (RULER) так, чтобы надпись "100; C+" появилась в окошке над участком шкалы с выбранной окраской.

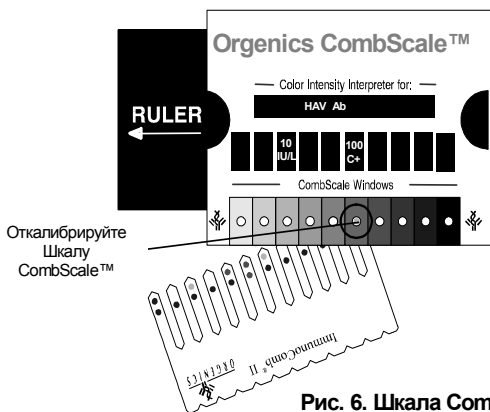


Рис. 6. Шкала CombScale™

- Считывайте результаты, не меняя калибровочного положения линейки. Сопоставьте интенсивность окраски каждой нижней точки с наиболее схожим вариантом на шкале. Точка с интенсивностью окраски **выше** или **равной** 10 МЕ/л (IU/L) указывает на **присутствие** антител к HAV в защитном титре. Точка с интенсивностью окрашивания слегка меньшей, чем 10 IU/L признается сомнительным результатом и образец должен анализироваться заново. Точка с интенсивностью окрашивания меньше, чем 10 IU/L считается отрицательным результатом.

Документация результатов

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

Ограничения

Тест-система **ImmunoComb® II HAV Ab** является скрининговым тестом. Результаты теста, указывающие на наличие антител к HAV не должны рассматриваться в качестве окончательного диагноза Гепатита А. Результаты данного теста должны рассматриваться совместно со всеми симптомами, клинической историей и результатами других лабораторных анализов данного пациента.

Показатели качества теста

Чувствительность и **специфичность** тест-системы **ImmunoComb® II HAV Ab** были проверены на панели из 461 образца в сравнении с результатами 3-х ELISA тестов. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнение результатов теста ImmunoComb® II HAV Ab с результатами ELISA методов на выявление антител к HAV.

EIA метод	ImmunoComb® II HAV Ab	
	Положительная	Отрицательная
Положительная	257	7
Отрицательная	2	195

Чувствительность – 97.3%

Специфичность – 98.9%

Повторяемость

Одна положительная сыворотка крови, содержащая антитела к HAV, была исследована в 12 повторях на 10 Гребнях, результаты учитывали визуально. Каждый раз был определен тот же титр HAV.

Воспроизводимость

3 положительные сыворотки крови, содержащие антитела к HAV, были исследованы 10 наборами различных серий, результаты учитывали визуально. Во всех исследуемых случаях наблюдался один и тот же титр HAV.

Перекрестные реакции

Перекрестные реакции с положительными пробами, содержащими, HIV, HBs Ag, HCV, практически отсутствовали.

Интерференция

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

Библиография

- Blaine H.**, 1991. Hepatitis A virus. In: Viral Hepatitis. (Hollinger FB, Purcell, RH, Robinson WS, Gerin JL, Ticehurst J, eds.) Raven Press, New York. pp 1-37.
- Decker R, Ling CM, Overby L, Frösner GG, Boggs J.** 1976. Serology of transmission of hepatitis A in humans. J Infect Dis 139:74-82

- Dienstag JL, Krugman S, Wong DC, Purcell RH.** 1976. Comparison of serological tests for antibody to hepatitis A antigen using coded specimens from individuals infected with MS-1 strain of hepatitis A virus. Infect Immun 14:1000-1003.
- Duermeyer W, Van der Veen J, Koster B.** 1978. ELISA in hepatitis A. Lancet 1:823-824.
- Frösner GG, Papaevangelou G, Butler R, Iwarson S, Lindholm A, Courouce-Pauty AM.** 1979. Antibody against hepatitis A in seven European countries. I. Comparison of prevalence data in different age groups. Am J Epidemiol 110:63-69.
- Herrera JL.** 1994. Serological diagnosis of viral hepatitis. S. Med. J. 87:677-684.
- Szmunes W, Dienstag JL, Purcell RH, Harley EJ, Stevens CE, Wong DC.** 1976. Distribution of antibody to hepatitis A antigen in urban adult populations. N Engl J Med 295: 755-759.
- Zaaijer HL, Leentvaart-Kuijpers A, Rotman H and Lelie PN.** 1993. Hepatitis A antibody titres after infection and immunization: Implications for passive and active immunization. J Med Virol 40:22-27.

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 in vitro
	Температурные ограничения
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
COMBSCALE	Шкала CombScale™
EC REP	Уполномоченный представитель в ЕС
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) 498 58 78

http://www.biograd.ru biograd@biograd.ru

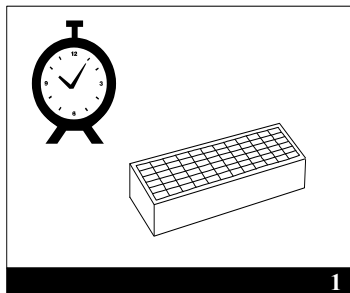
inverness medical innovations

Orgenics Ltd.,
P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel
Tel: + 972 8 942 92 01
Fax: + 972 8 943 87 58 ORGENICS
©2008 Inverness Medical. All rights reserved

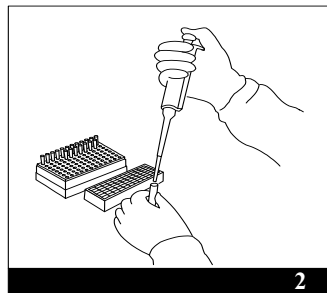
EC REP
MedNet GmbH
Borkstrasse 10
48163 Muenster - Germany
Tel: + 49 251 32266-0
Fax: + 49 251 32266-22

Version: 60456002/R5/OR/CE (02/2009)

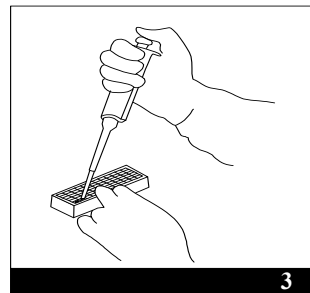
Описание основных этапов анализа



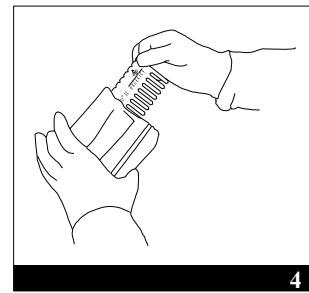
Подготовка Проявочной ванны: инкубация 45 минут при 37°C.



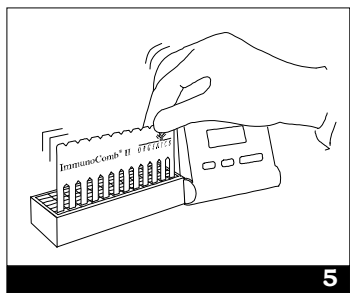
Забор и разведение образцов и контролей.



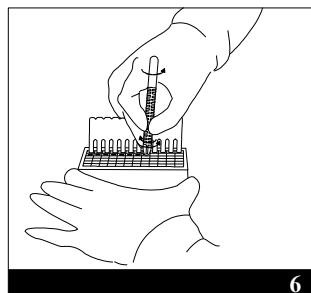
Добавление разбавленных проб и средств контроля в лунки ряда А.



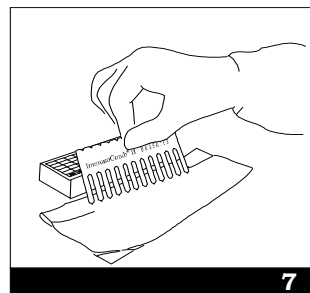
Извлечение Гребня из упаковки.



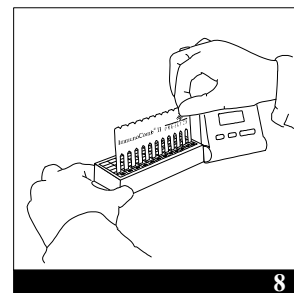
Введение Гребня в лунки ряда А и перемешивание. Инкубация при 37°C.



Перфорация фольги в лунках ряда В.



Удаление оставшейся жидкости с концов зубцов Гребня.

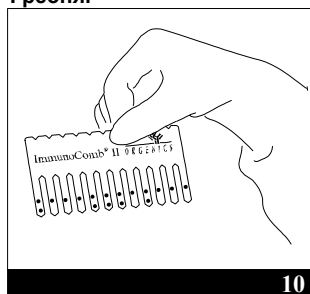


Введени Гребня в лунки ряда В. Инкубация.

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



Цветная реакция в ряду F



Результаты

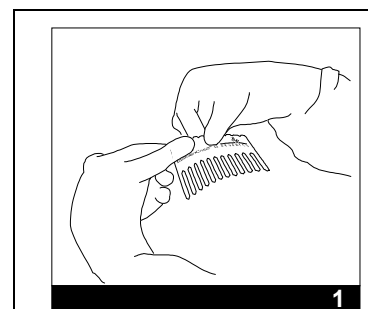
Краткое руководство по проведению анализов

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

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 45 минут
2. Проводить инкубации образцов при 37°C, промывки при комнатной температуре (22-26°C).
3. Предварительно разведите по 10 мкл каждого образца или контроля 490 мкл разбавителя образцов.
4. Внесите 25 мкл каждого разведенного образца или контроля в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
5. Вставьте Гребень в лунки ряда А, продолжайте в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Этап	Ряд	Действия
Захват Антитела	А	Перемешайте; инкубация 2 часа при 37° С; удалите капли
Промывка	В	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли.
Реакция Антиген-Антитело	С	Перемешайте; инкубация 30 мин. при 37° С; удалите капли.
Связывание с конъюгатом	D	Перемешайте; инкубация 20 мин при 37° С; удалите капли.
Промывка	Е	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли.
Хромоген	F	Перемешайте; инкубация 10 мин. при 37° С;
Остановка реакции	Е	Инкубация 1 мин.; сушка на воздухе.



1



2

Сгибание и разделение Гребня