



ImmunoComb® II

Rubella IgM


ORGENICS

CE
0459

Code: 60401002

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 IgM» - это быстрый тест для качественного определения IgM антител к вирусу Краснухи (Rubella) в сыворотке или плазме крови 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.

При острой инфекции специфические IgM антитела к вирусу краснухи появляются когда исчезает сыпь и обычно присутствуют не более 4 - 5 недель. IgM антитела практически не образуются, или образуются в следовых количествах при повторной инфекции, после вакцинации, после поликлональной стимуляции иммунной системы. Определение IgM антител

к вирусу краснухи указывает на острую инфекцию, что делает их определение полезным для эффективной дифференциации первичной инфекции от приобретенного иммунитета или повторного инфицирования. Образование IgM антител к Краснухе у внутриутробно инфицированного младенца может продолжаться около года после рождения. Измерение специфических IgM антител у новорожденных позволяет диагностировать внутриутробное инфицирование данным заболеванием.

Принцип анализа

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

верхняя точка - IgM 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 крови человека предварительно обрабатываются антителами к IgG человека (очищающий раствор), чтобы избежать помех, связанных с конкурирующим взаимодействием IgG антител к вирусу Краснухи и Ревматоидного фактора (RF). Предварительно обработанные образцы инкубируются в лунках ряда A Проявочной ванны. Затем в лунки ряда A вставляется Гребень. IgM антитела к вирусу Краснухи, если они присутствуют в образце, специфически связываются с антигенами вируса Краснухи на нижней точке зубцов Гребня (Рис.1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда B. В лунках ряда C захваченные нижней точкой зубца IgM антитела к вирусу Краснухи и IgM человека на верхних точках (Внутренний Контроль) вступают во взаимодействие с антителами к IgM человека, мечеными щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase, AP). В лунках следующих двух рядов 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.



Рисунок 1. Принцип анализа

В набор входят Положительный Контроль, содержащий IgM антитела к вирусу Краснухи и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов для подтверждения достоверности анализа. По завершении анализа, на зубце с Положительным Контролем должны проявиться две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна проявиться верхняя точка. 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 1 зубцу на каждый тест (Рис.2). Каждый зубец сенсibilизирован в двух чувствительных областях:

верхняя точка - IgM человека (Внутренний Контроль)

нижняя точка - инактивированными антигенами вируса Краснухи

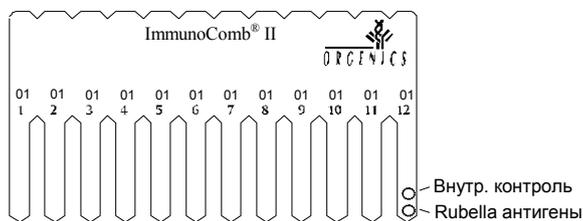


Рис.2. Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках с влагопоглотителем.

Проявочная ванна

В набор входят 3 Проявочные ванны. Каждая Проявочная ванна (Рис.3) содержит все необходимые для проведения анализа реагенты. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (А-Ф) по 12 лунок в каждом. Содержимое каждого ряда следующее:

Ряд А	Разбавитель образца, содержащий козы анти-тела к IgG человека	растворитель пробы, содержащий антитела козы к human IgG
Ряд В	промывочный раствор антитела к IgM человека, меченые щелочной фосфатазой (AP)	промывочный раствор козы antihuman IgM antibodies, меченные щелочной фосфатазой
Ряд D	промывочный раствор	промывочный раствор
Ряд Е	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 нитротетразол (NBT)

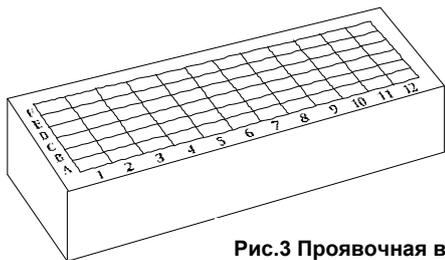


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль - 1 флакон (красная крышка) 0.25 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, содержащей IgM антитела к вирусу Краснухи.

Отрицательный Контроль - 1 флакон (зелёная крышка) 0.5 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека отрицательной по антителам к вирусу Краснухи.

Очищающий раствор – 1 флакон, содержащий 4 мл разведенных козых антител к IgG человека.

Перфоратор - для прокалывания алюминиевой фольги, покрывающей лунки Проявочной ванны.

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.

* 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.
- 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 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). Проводите инкубацию при температуре 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. Накройте 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 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 кодовый номер набора "01" 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.

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.

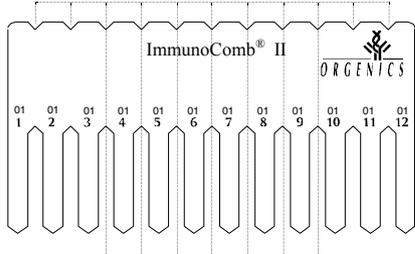


Рис. 4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Предварительная обработка образцов и контролей.

1. Для каждого образца и контроля введите по 100 мкл очищающего раствора в микропробирку или лунку микротитратора.
2. В каждую микропробирку или лунку добавьте 25 мкл образца либо контроля, входящих в состав набора. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.

Включите таймер, инкубируйте 10 минут при комнатной температуре (22–26°C).

Добавление предварительно обработанных образцов в Проявочную ванну

Примечание: Проводите инкубацию только при температуре 37°C! Промывку можно проводить при комнатной температуре (22–26°C).

3. Наберите в пипетку 25 мкл предварительно обработанного образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором фольгу в одной из ячеек ряда А Проявочной ванны и введите обработанный образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
4. Повторите этап 4 для других предварительно обработанных образцов и контролей. Используйте новую лунку ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца или контроля.
5. Включите таймер. Инкубируйте 10 минут при температуре 37°C.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А).

- а. Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание:** Вынимайте и снова вставляйте Гребень в лунки несколько раз.
- б. Оставьте Гребень в лунках ряда А и выдержите 30 минут при температуре 37°C. Включите таймер. За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
- в. Через 30 минут извлеките Гребень из лунок ряда А. **Удалите оставшуюся жидкость с заостренных концов зубцов Гребня** при помощи фильтровальной бумаги. Не касайтесь фронтальной поверхности зубцов.

Первая промывка (Ряд В).

7. Введите 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 7с.

Связывание с Конъюгатом (Ряд С).

8. Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Перемешайте** как на этапе 7а. Выдержите Гребень в Проявочной ванне в течение 20 минут (включите таймер) при температуре 37°C. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 20 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд D).

9. Введите Гребень в лунки ряда D. **Прополощите** в течение 2 минут, как на этапе 8. Тем временем проколите фольгу в лунках ряда Е. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Третья промывка (Ряд Е).

10. Вставьте Гребень в лунки ряда Е. **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).

11. Вставьте Гребень в лунки ряда F. **Перемешайте**. Выдержите Гребень в Проявочной ванне в течение 10 минут (включите таймер) при температуре 37°C. Через 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд Е).

12. Вставьте Гребень снова в лунки ряда Е. Через 1 минуту 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, очищающий раствор 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 (см. Рис.5):

1. На зубце с **Положительным контролем** должно проявиться **две точки**.
2. На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать **верхняя точка** (Внутренний Контроль). Нижняя точка либо отсутствует, либо она слабоокрашена и не влияет на интерпретацию результатов.
3. 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

Качественная интерпретация результатов

Визуальная интерпретация.

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

- Точка с интенсивностью окрашивания **большей или равной** чем у Положительного Контроля указывает на **присутствие IgM антител** к вирусу Краснухи.
- Точку с интенсивностью окрашивания **незначительно меньшей**, чем у Положительного Контроля следует рассматривать как **сомнительный результат** и образец следует проанализировать повторно.
- Слабую точку, с гораздо более слабой интенсивностью окрашивания, чем у Положительного контроля или её отсутствие следует считать **отрицательным** результатом.



Рис. 6. Результаты анализа

Документация результатов

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

Ограничения

Результаты этого анализа, как и результаты любых других анализов, предназначенных для диагностики *in vitro*, следует оценивать в совокупности со всеми симптомами, клинической историей болезни и результатами других лабораторных обследований пациента.

Показатели качества теста*

Специфичность и чувствительность тест-системы ImmunoComb® II Rubella IgM были проверены на панели из 593 образцов сывороток, в сравнении с ELISA референс-тестом. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты испытаний

Контрольный метод	ImmunoComb® II Rubella IgM	
	Положительный	Отрицательный
Результат		
Положительный	222	32
Отрицательный	3	336

* Подробные данные предоставляются по требованию.

Следующие показатели качества были вычислены исходя из результатов:

- Чувствительность – 87.4 %
- Специфичность – 99.1 %

Повторяемость

Произвольно было выбрано 10 Гребней из разных наборов одной

серии. Одна сыворотка положительная по IgM антителам к вирусу Краснухи была проверена 12 раз на каждом из выбранных Гребней. Во всех случаях были получены положительные результаты.

Воспроизводимость

4 положительных образца были проверены на Гребнях 3 различных серий. Каждый образец был протестирован несколько раз. Во всех случаях были получены положительные результаты.

Перекрёстные реакции

Перекрёстные реакции с образцами, положительными по другим герпесвирусам таким как Parvovirus, EBV, аутоиммунным заболеваниям, таким как ANA, тканевым антителам и Ревматоидному фактору (RF), были незначительными.

Нельзя полностью исключить лёгкую интерференцию у образцов положительных по CMV.

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. **Frenkel LD, Bellanti JA.** 1982. Immunology of measles, mumps and rubella viruses. In: Nahmias AJ, O'Reilly RJ, eds. Immunology of Human Infection, Part II: Viruses and Parasites; Immunodiagnosis and Prevention of Infectious Diseases. Plenum Medical Book Co., New York. pp. 135-163.
4. **Ray CG.** 1984. Viruses of mumps and childhood exanthemes. In: Sherris JC, ed. Medical Microbiology - an Introduction to Infectious Diseases. Elsevier, New York. pp. 383-387.

Условные обозначения

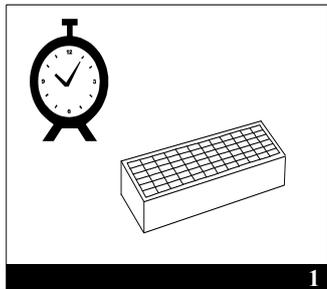
	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контроль
	Отрицательный Контроль
	Перфоратор
	Очищающий раствор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы
	Изделие медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
	Ограничения температуры
	Содержимого 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»

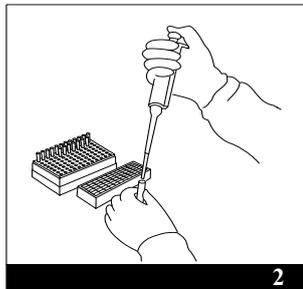
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

	<table border="1"><tr><td>EC</td><td>REP</td></tr><tr><td colspan="2">MedNet GmbH</td></tr><tr><td colspan="2">Borkstrasse 10</td></tr><tr><td colspan="2">48163 Muenster - Germany</td></tr><tr><td colspan="2">Tel: + 49 251 32266-0</td></tr><tr><td colspan="2">Fax: + 49 251 32266-22</td></tr><tr><td colspan="2">Version: 60401002/R4/OR/CE (03/2009)</td></tr></table>	EC	REP	MedNet GmbH		Borkstrasse 10		48163 Muenster - Germany		Tel: + 49 251 32266-0		Fax: + 49 251 32266-22		Version: 60401002/R4/OR/CE (03/2009)	
EC	REP														
MedNet GmbH															
Borkstrasse 10															
48163 Muenster - Germany															
Tel: + 49 251 32266-0															
Fax: + 49 251 32266-22															
Version: 60401002/R4/OR/CE (03/2009)															
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															

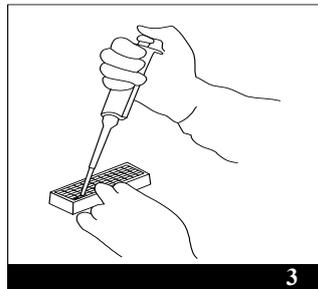
Описание основных этапов анализа



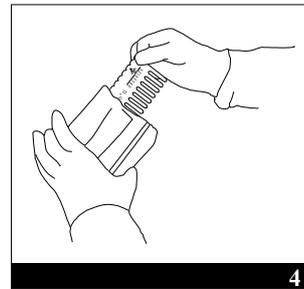
Подготовка Проявочной ванны: Инкубация 45 минут при 37°C.



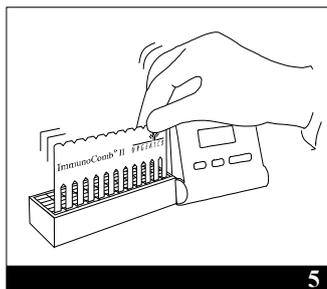
Забор образцов и контролей для предварительной обработки.



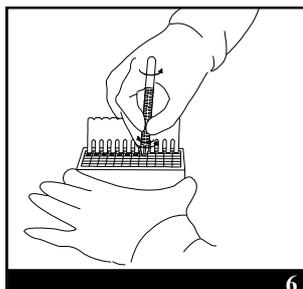
Внесение предварительно обработанных образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание. Инкубация при 37°C.



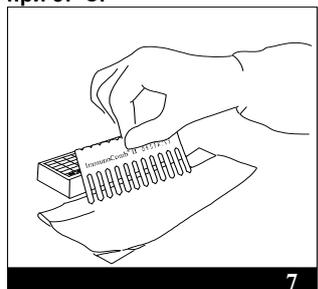
Извлечение Гребня из упаковки.



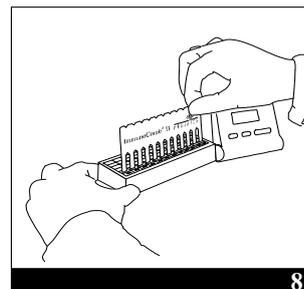
Введение Гребня в лунки ряда А. Перемешивание. Инкубация.



Вскрытие лунок ряда В перфоратором.

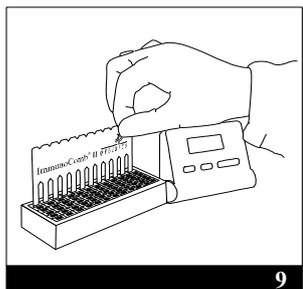


Удаление капель жидкости с зубцов Гребня

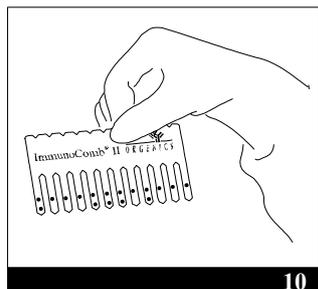


Введение Гребня в лунки ряда В. Перемешивание, инкубация.

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



Цветная реакция в ряду F



Результаты

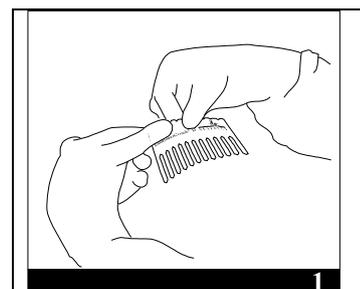
Краткое руководство по проведению анализов

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

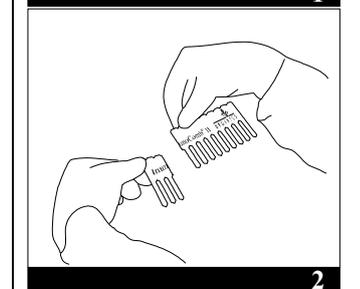
1. Инкубируйте Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 45 минут.
2. Предварительно обработайте 25 мкл каждого образца и контроля, смешав со 100 мкл Очищающего раствора с последующей инкубацией в течение 10 минут при комнатной температуре (22–26°C).
3. Введите 25 мкл предварительно обработанных образцов и контролей в лунки ряда А Проявочной ванны. Перемешайте и выдержите 10 минут при температуре 37°C.
4. Вставьте Гребень в лунки ряда А, продолжайте в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Этап	Ряд	Действия
Реакция Антиген-Антитело	A	Перемешайте; инкубация 30 мин. при 37 °C; удалите капли
Промывка	B	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли.
Связывание с Конъюгатом	C	Перемешайте; инкубация 20 мин. при 37 °C; удалите капли.
Промывка	D	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли.
Промывка	E	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли.
Окрашивание	F	Перемешайте; инкубация 10 мин. при 37 °C;
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин.; сушка на воздухе.



1



2

Сгибание и разделение Гребня