



ImmunoComb® II

ИммуноКомб® II
HBs Ag 90



Code: 60454002

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 HBs Ag 90» это быстрый бесприборный тест для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) в сыворотке или плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) принадлежит к новому семейству ДНК вирусов *Herpadnaviridae*. К его особенностям относятся паразитический гепатотропизм и уникальный способ репликации с использованием механизма обратной транскрипции. Вирион, или частица Дейна, состоит из кольцевой молекулы ДНК, защищенной нуклеокапсидом/соге-антигеном (HBsAg), и окруженной липопротеиновой оболочкой, состоящей из поверхностного антигена (HBsAg). HBsAg также обнаруживается в сыворотке в виде незавершенных неинфекционных сферических частиц или нитей. Входящий в нуклеокапсид ВГВ в небольшом количестве HBe антиген (HBeAg) также можно обнаружить в крови во время репликативной фазы вируса.

ВГВ является широко распространенным по всему миру вирусом. Основные пути заражения: горизонтальный - половое и парентеральное заражение, и вертикальный - пренатальная передача от инфицированной матери плоду. Клинические последствия заражения ВГВ варьируют от полностью незаметных (70% случаев) до острых желтушных гепатитов. Большинство пациентов полностью выздоравливают в течение 6 месяцев с начала заболевания. У небольшой доли инфицированного населения (<1.5%) могут развиться скоротечные гепатиты, часто с летальным исходом. У значительной части (до 10%) взрослого населения ВГВ может сохраняться, постепенно переходя в хронический гепатит, конечным этапом развития которого являются цирроз печени и гепатокарцинома. Хронические носители вируса

гепатита В (200 миллионов по всему миру) составляют основной резервуар вируса и способствуют распространению заболевания

В типичных случаях вирусного гепатита В, HBs-антиген, часто совместно с HBe-антигеном, появляется в крови за 2-6 недель до проявления симптомов заболевания или биохимического подтверждения гепатита, и его количество достигает пика во время острой фазы болезни. Присутствие HBs-антигена в сыворотке в течение более 6 месяцев отражает статус хронического носителя ВГВ. Скрининг на присутствие HBs-антигена позволяет выявлять инфицированных лиц, помогает в установлении диагноза и прогноза заболевания.

ИФА тест-система «ИммуноКомб® II HBs Ag 90» - быстрый и чувствительный тест для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В, в том числе для экспресс-диагностики, для скрининга банка крови, для экстренного и индивидуального обследования, в т.ч. лиц, подозреваемых в носительстве ВГВ.

Принцип анализа

В тест-системе **ImmunoComb® II HBs Ag** используется твёрдофазный иммуноферментный анализ (ИФА), «сэндвич» - вариант (метод двойных антител). Твёрдой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами).

Каждый зубец сенсibiliзирова н в двух местах:

верхняя точка - биотинилированным альбумином бычьей сыворотки БСА (Внутренний Контроль)

нижняя точка - моноклональными антителами к HBs Ag.

Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A - F) по 12 лунок, каждый ряд содержит готовые к использованию растворы реагентов для различных стадий анализа (Рис. 2). Анализ проводят, последовательно перенося Гребень из одного ряда лунок в другой, с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа исследуемые образцы сыворотки или плазмы вносят в лунки ряда А Проявочной ванны. После чего 20 мкл разбавителя образца добавляют в каждую лунку ряда А. Затем в лунки ряда А вставляют Гребень. HBs Ag, если он присутствует в образцах, связывается с антителами к HBs Ag на нижней точке зубца Гребня (Рис.1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С HBs Ag, захваченный нижними точками зубцов, будет взаимодействовать с биотинилированным антителами к HBs Ag. В ряду D биотинилированный комплекс антиген/антитело на нижней точке зубца и биотинилированный БСА верхней точки зубца (внутренний контроль) будут взаимодействовать с авидином, меченным щелочной фосфатазой (AV-AP-конъюгат). В ряду Е не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В лунках ряда F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенными компонентами. Результаты реакции наблюдают в виде серо-синих точек на поверхности зубца Гребня.

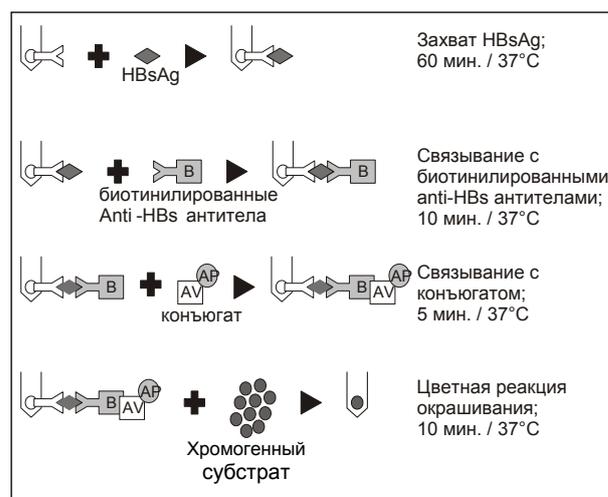


Рис. 1 Принцип анализа

В набор входит Положительный Контроль (содержащий HBs Ag) и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов. По завершении анализа на зубце с положительным контролем должны проявиться две серо-синие точки. На зубце с отрицательным контролем должна проявиться только верхняя точка. Верхняя точка

также должна проявиться на всех остальных зубцах, подтверждая, что набор работает правильно и тест выполнен корректно.

Состав набора

Гребни

В Набор входят 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 - биотинилированным альбумином бычьей сыворотки (Внутренний Контроль)

нижняя точка - моноклональные антитела к HBs Ag.

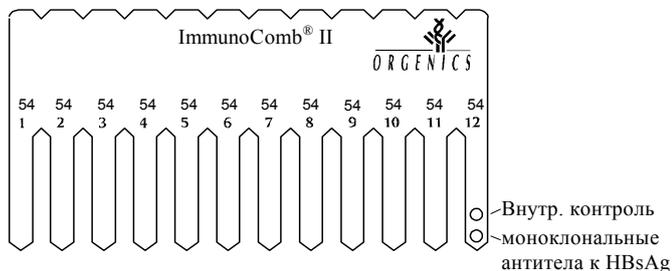


Рис. 2 Гребень

Проявочные ванны

В набор входят 3 Проявочные ванны, покрытые алюминиевой фольгой. Каждая из них (Рис. 3) содержит все реагенты, необходимые для проведения анализа. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A-F) по 12 лунок в каждом. Содержимое каждого ряда следующее:

Ряд А	пустой, предназначен для внесения образца и разбавителя
Ряд В	промывочный раствор
Ряд С	биотинилированные козы антитела к HBs Ag
Ряд D	конъюгат модифицированного авидина 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)

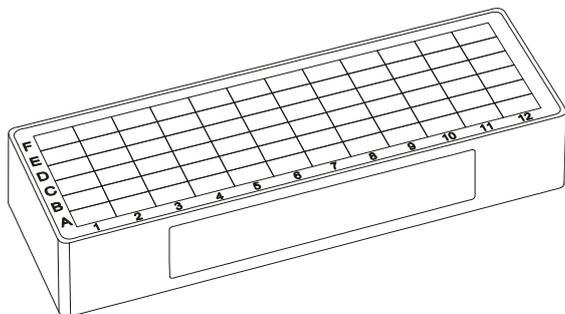


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль - 1 флакон (красная крышка) 1.5 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, не содержащей HBs Ag, с добавлением 50 нг/мл рекомбинантного HBs Ag

Отрицательный Контроль - 1 флакон (зелёная крышка) 1.5 мл разбавленной инактивированной нагреванием плазмы крови человека отрицательной по антителам к HBs Ag.

Разбавитель образца – 1 флакон (белая крышка), 2 мл.

Перфоратор — пластиковый стержень 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.
- 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 100 мкл и 20 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.

Подготовка к анализу

Процедуру анализа проводите при температуре 37°C.

Подготовка Проявочной ванны

- Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течении 45 минут.
- 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. Вскрываете фольгу только в соответствии с указаниями инструкции по проведению анализа с помощью сменного наконечника пипетки или перфоратора.

Подготовка Разбавителя

- Выдержите разбавитель образца, исследуемые образцы и контроли при температуре 37°C в течение 15 минут

Подготовка Гребня

Внимание: Чтобы обеспечить правильное функционирование теста, не прикасайтесь к зубцам Гребня.

- Разорвите пакет с Гребнем вдоль надсеченного края. Извлеките Гребень.

* За исключением хранения для документации

2. Гребень и Проявочную ванну можно использовать целиком или только их часть. Для использования части Гребня:
- Определите количество зубцов, необходимых для тестирования образцов и контролей. Вам потребуется по одному зубцу на каждый анализ. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "54" для того, чтобы всегда можно было определить, к какому набору принадлежит отдельно взятый зубец.
 - Согните Гребень по вертикали, 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.

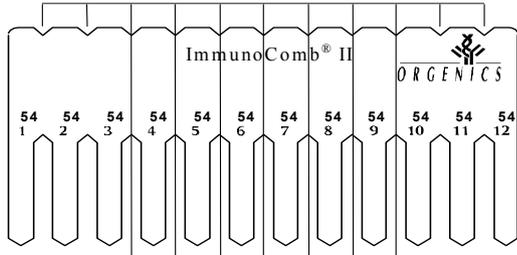


Рис.4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

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

Описанная ниже процедура позволяет определять HBsAg в концентрации 0,25 — 0,5 нг/мл.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А).

- Наберите в пипетку 100 мкл образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором фольгу в одной из лунок ряда А Проявочной ванны и введите обработанный образец на дно лунки. Добавьте в эту лунку 20 мкл разбавителя образца. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
- Повторите этап 1 для других исследуемых образцов и контролей. Используйте новую лунку ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца или контроля. *Для получения наилучших результатов рекомендуется выдержать Проявочную ванну с внесенными контрольными и исследуемыми образцами и разбавителем при температуре 37°C в течение 15 минут.*
- Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание:** Вынимайте и снова вставляйте Гребень в лунки несколько раз.
 - Оставьте Гребень в лунках ряда А и выдержите 60 минут **при температуре 37°C**. Включите таймер. Перемешивайте дополнительно через 30 минут инкубации. За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
 - Через 60 минут извлеките Гребень из лунок ряда А. **Удалите оставшуюся жидкость с заостренных концов зубцов Гребня** при помощи чистой фильтровальной бумаги. Не касайтесь фронтальной поверхности зубцов.

Первая промывка (Ряд В).

- 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 3с.

Связывание с Биотинилированным HBsAg (Ряд С).

- Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Перемешайте** как на этапе 3а. Выдержите Проявочную ванну с Гребнем в

течение 10 минут (включите таймер) **при температуре 37°C**. Дополнительно **перемешайте** один раз во время инкубации. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 10 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Связывание со Стрептавидином/Щелочной фосфатазой (Ряд D).

- Вставьте Гребень в лунки ряда D. **Перемешайте**. Выдержите Проявочную ванну с Гребнем 5 минут (включите таймер) **при температуре 37°C**. Дополнительно **перемешайте** один раз во время инкубации. Проколите фольгу лунок ряда E. Через 5 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд E).

- Вставьте Гребень в лунки ряда E. Несколько раз **прополощите** в течение 2 минут, как на этапе 4. 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°C**. Через 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд E).

- Снова вставьте Гребень в лунки ряда E. 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, разбавитель образца и инструкцию 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):

- На зубце с **Положительным контролем** должно проявиться **две точки**.
- На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать только **верхняя точка** и никаких других точек (Внутренний Контроль).
- На каждом зубце тестируемых **образцов** должна проявиться **верхняя точка** (Внутренний Контроль).



Рис. 5 Достоверность результата

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



Рис. 6. Результаты анализа

1. Появление на зубце тестируемого образца только **верхней точки** (внутренний контроль) указывает на то, что исследуемый образец **не содержит** поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) (а).
2. Появление на зубце тестируемого образца любой, даже слабоокрашенной, **нижней точки** указывает на **присутствие** поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag), независимо от интенсивности окрашивания (б).

Внимание!

Любая слабоокрашенная нижняя точка зубцов должна рассматриваться как возможный положительный результат и подвергаться дальнейшим исследованиям.

Документация результатов

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

Ограничения

Положительные результаты теста «ИммуноКомб® II HBs Ag 90'» говорят о присутствии поверхностного антигена ВГВ. Однако, как и с другими тестами, предназначенными 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

Чувствительность и специфичность Теста «ИммуноКомб® II HBs Ag 90'» была изучена на панели из 203 образцов сывороток в сравнении с системой Abbot Axsym в качестве референс-теста. Результаты приведены в таблице:

		«ИммуноКомб® II HBs Ag 90'»	
		положительные	отрицательные
Референс тест	положительные	112	1
	отрицательные	0	90

Следующие показатели качества тест-системы «ИммуноКомб® II HBs Ag 90'» были вычислены исходя из этих результатов:

Чувствительность - 99%; Специфичность —100%.

Повторяемость

Одна положительная сыворотка крови, содержащая HBs Ag, была исследована в 12 повторах на 10 Гребнях, результаты учитывали визуально. Все результаты были интерпретированы как положительные.

Воспроизводимость

3 положительные сыворотки крови, содержащие HBs Ag, были исследованы 10 наборами различных серий, результаты учитывали визуально. Все результаты были интерпретированы как положительные.

Перекрёстные реакции

Перекрёстные реакции с положительными образцами, содержащими HAV, HAV IgM, HBc, HIV, HBs Ab, HCV, HTLV, Rubella, CMV, Toxoplasma практически отсутствовали.

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 высоким билирубином (до 20 мг/дл)

Условные обозначения

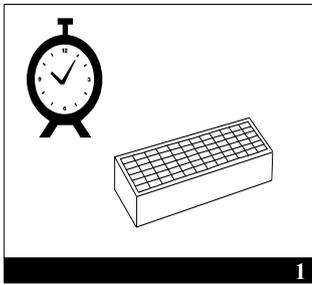
	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контрольный образец
	Отрицательный Контрольный образец
	Перфоратор
	Разбавитель образца
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание! Ознакомьтесь с сопровождающими документами
	Изделие медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурные 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»

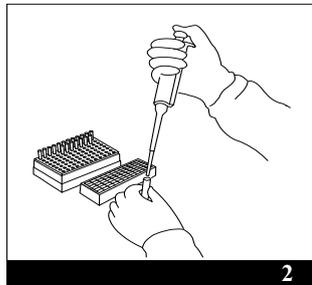
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

inverness medical innovations

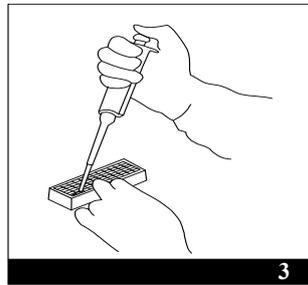
 Orgenics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 <small>©2008 Inverness Medical. All rights reserved</small>	 MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22
	Version: 60454002/R4/OR (03/2009)



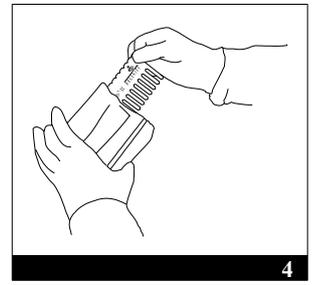
1
Подготовка
Проявочной ванны. Инкубация
45 минут при 37°C



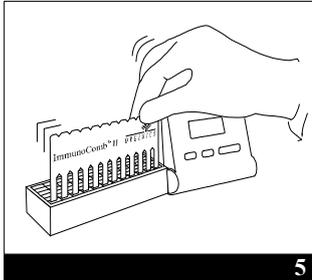
2
Забор образцов и контролей



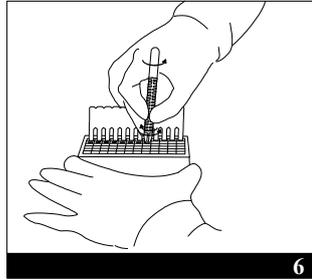
3
Добавление образцов и
контролей в лунки ряда А
Проявочной ванны.
Перемешивание



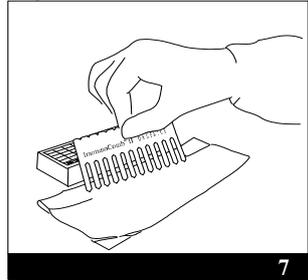
4
Извлечение Гребня
из упаковки



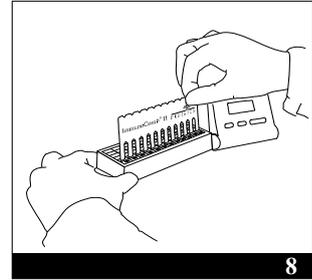
5
Введение Гребня в лунки
ряда А и перемешивание.
Инкубация при 37°C



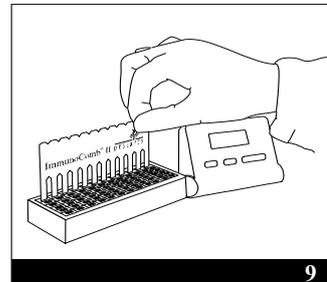
6
Вскрытие лунок ряда В
перфоратором



7
Удаление капель жидкости с
заостренных концов зубцов
Гребня

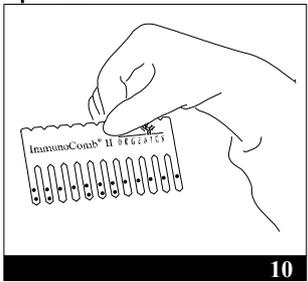


8
Введение Гребня в лунки
ряда В и промывание.
Инкубация



9
После перемешивания /
полоскания и инкубации
в рядах С, D и E ...

Реакция окрашивания в
ряду F



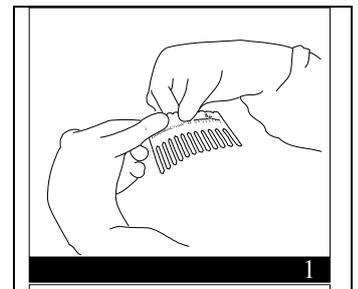
10
Результаты

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

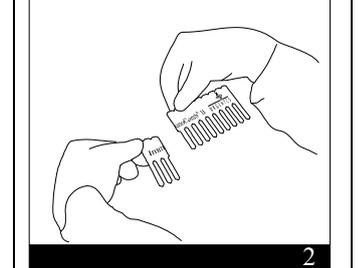
Эта краткая инструкция предназначена для лиц, имеющих опыт использования тест-систем «ИммуноКомб® II HBs Ag 90».

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 45 минут, разбавитель образца, контрольные и исследуемые образцы выдержать 15 минут при 37°C.
2. Проводить инкубации образцов при 37°C, промывки при комнатной температуре (22-26°C).
3. Внести по 100 мкл каждого исследуемого и контрольных образцов в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешать.
4. Добавить в те же лунки ряда А по 20 мкл разбавителя образца, перемешать.
5. Вставить Гребень в ряд А и следовать указаниям таблицы:

Стадия	Ряд	Порядок действий
Захват антигена	А	Перемешайте, инкубация 60 мин при 37°C (повторно перемешать по истечении 30 мин), удалите капли
Промывка	В	Перемешайте, инкубация 2 мин, удалите капли
Связывание с биотинилированными анти-HBs антителами	С	Перемешайте, инкубация 10 мин при 37°C, удалите капли
Реакция с конъюгатом	D	Перемешайте, инкубация 5 мин при 37°C, удалите капли
Промывка	E	Перемешайте, 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