



ImmunoComb® II

Anti-HBs



Code: 60453002

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 Anti-HBs » - это быстрый тест для количественного определения антител к поверхностному антигену вируса Гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) принадлежит к новому семейству ДНК вирусов *Hepadnaviridae*. К его особенностям относятся поразительный гепатотропизм и уникальный способ репликации с использованием механизма обратной транскрипции. Вирион, или частица Дейна, состоит из кольцевой молекулы ДНК, защищенной нуклеокапсидом/сге-антигеном (НВсАг), и окруженной липопротеиновой оболочкой, состоящей из поверхностного антигена (НВsАг). НВsАг также обнаруживается в сыворотке в виде незавершенных неинфекционных сферических частиц или нитей. Входящий в нуклеокапсид ВГВ в небольшом количестве НВе антиген (НВеАг) 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 неразличимых (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 развиваться 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

60453002/R5/OR/CE

(200 миллионов по всему миру) составляют основной резервуар вируса и являются источником распространения болезни. Антитела к НВsАг (анти-НВs) являются основными антителами, нейтрализующими ВГВ, обычно сохраняются на протяжении всей жизни и защищают от повторного инфицирования. Уровень anti-HBs служит индикатором выздоровления от ВГВ инфекции или успешной вакцинации с использованием частиц НВsАг. Концентрация антител ≥ 10 IU/L указывает на выработанный иммунитет к ВГВ.

Принцип анализа

В тест-системе ImmunoComb® II Anti-HBs используется твёрдо-фазный иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на методе двойного распознавания. Твёрдой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами).

Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах:

верхняя точка - биотинилированным альбумином бычьей сыворотки (Внутренний Контроль)

нижняя точка - рекомбинантным НВsАг.

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. Анализ проводится поэтапно, Гребень последовательно переносится из одного ряда лунок в другой с инкубацией на каждом этапе.

Образцы сыворотки или плазмы крови человека добавляются к растворителю в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляется Гребень. Специфические антитела, если они присутствуют в образце, связываются с НВsАг на нижней точке зубца Гребня (Рис. 1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. Захваченные нижней точкой зубца антитела к НВsАг будут взаимодействовать с биотинилированным НВsАг в лунках ряда С. В лунках ряда D биотинилированный комплекс антиген / антитело на нижних точках зубцов и биотинилированный альбумин бычьей сыворотки на верхних точках (Внутренний контроль) взаимодействуют со стрептавидином, связанным с щелочной фосфатазой (AP). В лунках ряда Е 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.

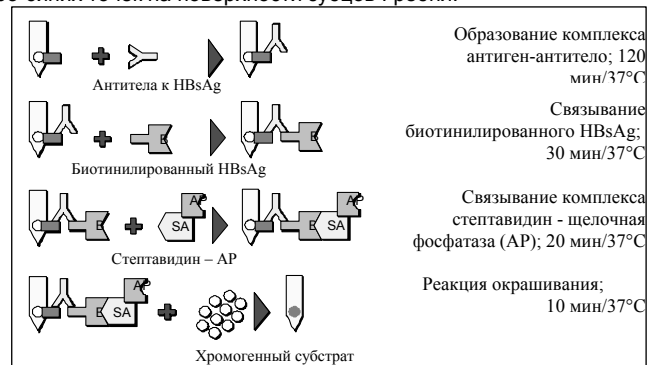


Рис. 1 Принцип анализа

В набор входят Положительный Контроль, содержащий антитела к НВsАг и Отрицательный Контроль, которые должны использоваться 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 появиться 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

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 - рекомбинантным НВsАг

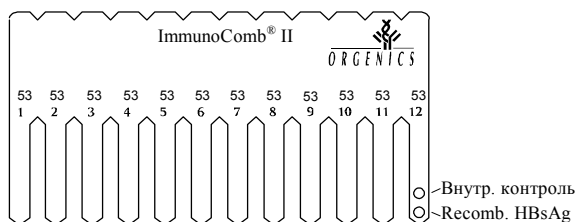


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках с влагопоглотителем.

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 растворитель образцов

Ряд В промывочный раствор

Ряд С биотинилированный HBsAg.

Ряд D стрептавидин, меченный щелочной фосфатазой

Ряд E промывочный раствор

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

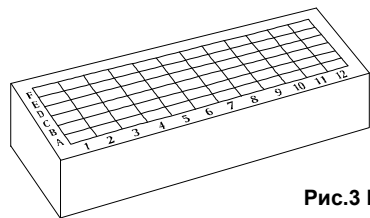


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль — 1 флакон (красная крышка) 1.5 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, разбавленной до учетного уровня антител к HBsAg 10 ME/л (IU/L).

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

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

CombScale™ — шкала для считывания результатов анализа.

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 Гребнем*, 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.

* За исключением хранения для документации

- 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.
- 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 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) 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 "53" 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.
 - 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.

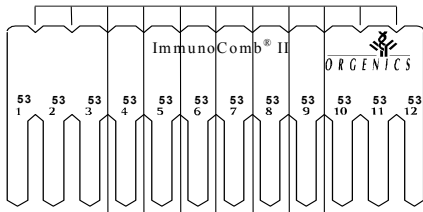


Рис.4. Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Примечание: Проводите инкубацию только при температуре **37°C!** Промывки проводите при комнатной температуре (22-26°C).

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 образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
- Повторите этап 1 для других предварительно обработанных образцов и контролей. Используйте новую лунку ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца или контроля.
- 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 120 минут при температуре 37°C. Включите таймер. Перемешайте дополнительно 3 раза (через каждые 30 минут) на протяжении всей инкубации. За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
 - Через 120 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 30 минут (включите таймер) при температуре 37°C. Проколите фольгу лунок ряда D. Дополнительно перемешайте еще один раз в процессе инкубации. Через 30 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 20 минут (включите таймер) при температуре 37°C. Проколите фольгу лунок ряда E. Дополнительно перемешайте еще один раз в процессе инкубации. Через 20 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 ровно 10 минут (включите таймер) при температуре 37°C. Через 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд E).

- Вставьте Гребень снова 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 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 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 **верхняя точка** (Внутренний Контроль). Нижняя точка либо отсутствует, либо она слабоокрашена и 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

Скрининг

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

- Точка с интенсивностью **большей или равной** точке **Положительного Контроля** указывает на **присутствие** антител к HBsAg антител в титре ≥ 10 IU/L.
- Точка с интенсивностью окрашивания **меньшей** точки **Положительного контроля** считается **отрицательным** результатом.



Рис. 6 Результаты теста

Количественная визуальная интерпретация результатов.

Уровень антител к HBsAg 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 HBsAg. Поместите **нижнюю** точку на зубце с **Положительным Контролем** под наиболее подходящий по интенсивности окраски участок на шкале. Сдвиньте линейку (RULER) так, чтобы надпись "10; C+" появилась в окошечке над участком шкалы с выбранной окраской.
- Считывайте результаты, **не меняя калибровочного положения линейки**. Для каждой нижней точки исследуемых образцов подберите участок шкалы наиболее близкий по интенсивности окраски. Запишите число в окошке над этим участком.

ком как концентрацию в МЕ/л (IU/L) антител к HBsAg в этом образце.

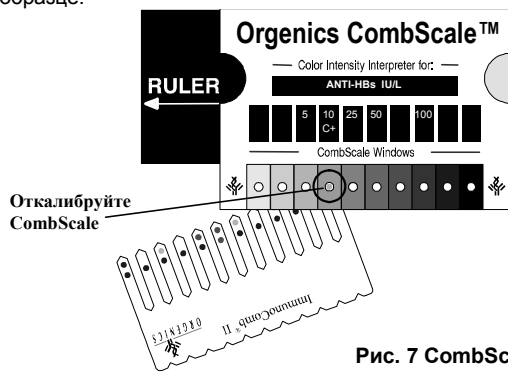


Рис. 7 CombScale

Документация результатов

Так как окраска точек стабильна, Гребни можно хранить для 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 исследований пациента.

Показатели качества теста*

Чувствительность и специфичность тест-системы ImmunoComb® II Anti-HBs определялись на панели из 170 образцов, в сравнении с двумя ИФА референс-тестами. Полученные результаты приведены в таблице 2

Таблица 2. Результаты испытаний.*

Контрольный метод	ImmunoComb® II Anti-HBs	
	Положительная	Отрицательная
Положительная	50	0
Отрицательная	2	118

Следующие показатели качества были вычислены исходя из полученных результатов:

- Чувствительность – 100%
- Специфичность – 98.3%

Повторяемость

6 положительных сывороток были исследованы по 12 раз, результаты определялись количественно как значения интенсивности окраски (поглощения). Коэффициент вариации измеренных показателей не превышал 10 %.

Воспроизводимость

6 положительных сывороток исследовались на 10 разных наборах, результаты определялись количественно как значения интенсивности окраски (поглощения). Коэффициент вариации измеренных показателей не превышал 10 %.

Перекрестные реакции

Перекрестные реакции с образцами, положительными по агентами вызывающими гепатит, такими как вирусы Гепатита А, Гепатита С, Цитомегаловирусу и Токсоплазме были не значительными.

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. Follet EAC. 1988. Diagnosis of hepatitis B infection. *In: Hugh Y, McMillan A, eds. Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases. Marcel Dekker, New York. pp. 433-450.*
2. Herrera JL. 1994. Serological diagnosis of viral hepatitis. *S Med J 87:677-684.*
3. Hollinger FB. 1991. Hepatitis B virus. *In: Viral Hepatitis. (Hollinger FB, Purcell RH, Robinson WS, Gerin JL, Ticehurst J, eds.) Raven Press, New York. pp 73-138.*

* Подробные данные предоставляются по требованию.

4. Kiyasu PK, Caldwell SH. 1993. Diagnosis and treatment of the major hepatotropic viruses. *Am J Med Sci 306:248-261.*
5. Krugman S, Overby LR, Mushawar IK, Ling C-M, Frösner GG, Deinhart F. 1979. Viral hepatitis, type B: studies on natural history and prevention re-examined. *N Engl J Med 300:101-106.*
6. Ogra PL, Beutner KR. 1981. Hepatitis viruses. *In: Milgrom F, Abeyounis CJ, Kano K, eds. Principles of immunological diagnosis in medicine. Lea & Febiger, Philadelphia. pp 247-259.*
7. Robinson WS. 1991. Hepadnaviridae and their replication. *In: Viral Hepatitis. (Hollinger FB, Purcell RH, Robinson WS, Gerin JL, Ticehurst J, eds.) Raven Press, New York. pp 39-71.*
8. Swenson PD. 1991. Hepatitis viruses. *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 959-983.*

Условные Обозначения

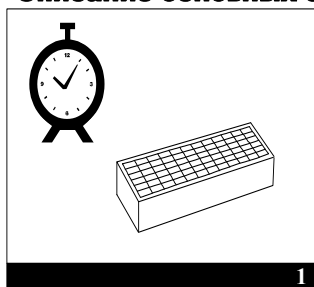
CARD	Гребень
PLATE	Проявочная ванна
CONTROL +	Положительный Контроль
CONTROL -	Отрицательный Контроль
PERFORATOR	Перфоратор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы
IVD	Изделие медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
	Ограничения Температуры
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
COMBSCALE	Шкала CombScale™
REF	Каталожный Номер
LOT	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
SN	Серийный номер

Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»

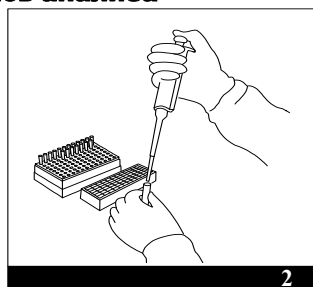
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

inverness medical innovations	
	EC REP
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	MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22
	Version: 60453002/R5/OR/CE (03/2009)

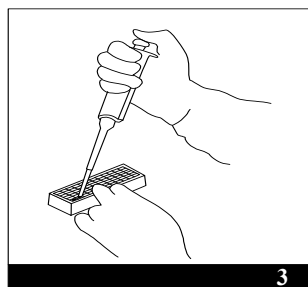
Описание основных этапов анализа



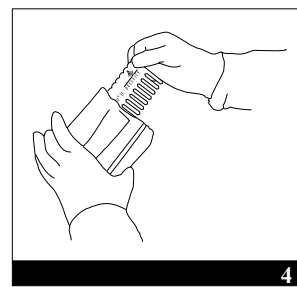
1
Подготовка
Проявочной ванны. Инкубация
45 минут при 37°C



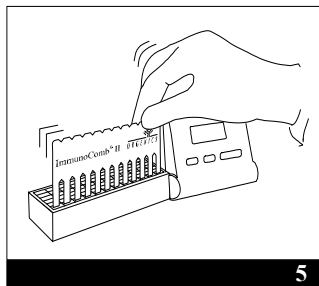
2
Забор образцов и контролей



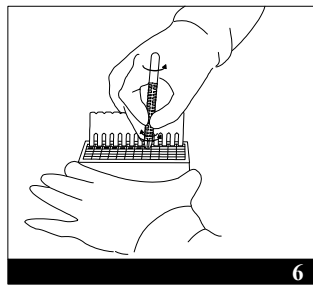
3
Добавление образцов и
контролей в лунки ряда А
Проявочной ванны.
Перемешивание



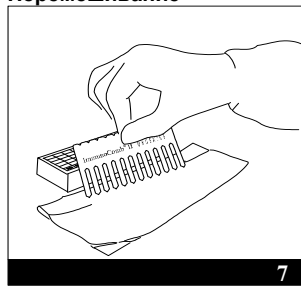
4
Извлечение Гребня
из упаковки



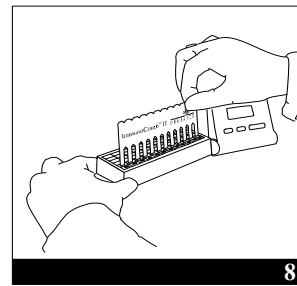
5
Введение Гребня в лунки
ряда А и перемешивание.
Инкубация при 37°C



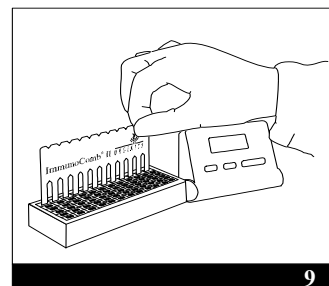
6
Вскрытие лунок ряда В пер-
форатором



7
Удаление капель жидкости с
заостренных концов зубов
Гребня



8
Введение Гребня в лунки
ряда В и промывание.
Инкубация



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

10
Реакция окрашивания в
ряду F

Результаты

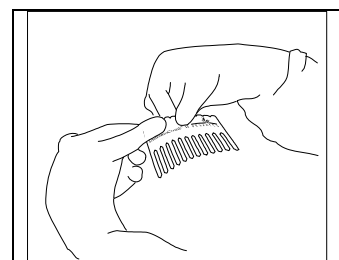
Краткое описание процедуры анализа

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

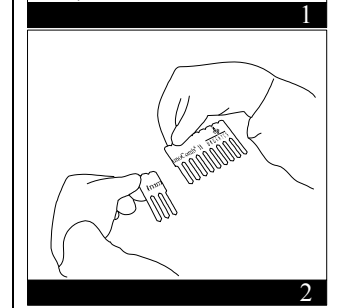
1. Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 45 минут, доведите все необходимые компоненты набора до комнатной температуры.
2. Введите по 100 мкл образцов и контролей в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
3. Вставьте Гребень в лунки ряда А и продолжайте анализ в соответствии с таблицей 1:

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Шаг	Ряд	Действия
Реакция Антиген-Антитело	A	Перемешайте; инкубация 120 мин при 37 °С, перемешивание через каждые 30 мин; удалите капли
Промывка	B	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли
Связывание с биотинилированным HBsAg	C	Перемешайте; инкубация 30 мин при 37°C, дополнительное перемешивание; удалите капли
Связывание со стрептавидином / щелочной фосфатазой	D	Перемешайте; инкубация 20 мин при 37°C, дополнительное перемешивание; удалите капли
Промывка	E	Прополощите; инкубация 2 мин; удалите капли
Окрашивание	F	Перемешайте; инкубация 10 мин. при 37 °С
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин.; сушка на воздухе



1



2

Сгибание и разделение
Гребня