



ImmunoComb® II

HBc IgG



Code: 60450002

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 HBc IgG» - это быстрый тест для качественного определения IgG антител к HBcAg - core-антигену вируса гепатита В (ядерный, коровый или сердцевинный антиген вируса гепатита В в русскоязычной литературе), 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 паразитический гепатотропизм и уникальный способ репликации с использованием механизма обратной транскрипции. Вирион, или частица Дейна, состоит из кольцевой молекулы ДНК, защищенной нуклеокапсидом/core-антигеном (HBcAg), 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 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 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

60450002/R5/OR/CE

(200 миллионов по всему миру) составляют основной резервуар вируса и являются основным источником распространения болезни.

Во время активной фазы болезни в организме появляются как IgM, так и IgG антитела к вирусному core-антигену (HBcAg). В то время как анти-HBc IgM быстро исчезают, анти-HBc IgG сохраняются на годы. Поэтому анти-HBc IgG являются удобным индикатором для определения предшествующих контактов с ВГВ. Более того, анти-HBc IgG являются единственным маркером, который можно обнаружить во время так называемого серологического окна острого гепатита В, периода после исчезновения HBsAg и когда антитела к HBsAg, указывающие на устранение вируса, еще невозможно обнаружить.

**Принцип анализа**

В тест-системе ImmunoComb® II HBc IgG используется метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами).

Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах:

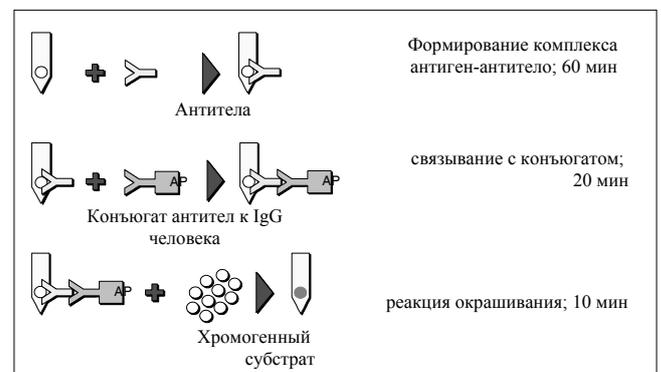
**верхняя точка** – иммуноглобулинами человека (Внутренний контроль)

**нижняя точка** – рекомбинантным HBcAg

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 разводятся в соотношении 1:10 и добавляются к растворителю в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем Гребень вводится в лунки ряда А. Антитела к HBcAg, если таковые имеются в образцах, специфически связываются с HBcAg на нижней точке зубцов Гребня (Рис.1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С захваченные IgG антитела к HBcAg на нижней точке зубцов и иммуноглобулины человека на верхних точках (Внутренний контроль), будут взаимодействовать с антителами к IgG человека, мечеными щелочной фосфатазой (AP). В следующих 2 рядах 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 IgG антитела к HBcAg и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов для подтверждения достоверности анализа. По завершении анализа, на зубце с Положительным Контролем должны быть две серо-синих точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна появиться верхняя точка, нижняя точка либо отсутствует, либо она 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 зубцу на каждый тест (Рис.2). Каждый зубец сенсibilизирован в двух чувствительных областях:

**верхняя точка** – иммуноглобулинами человека (Внутренний контроль)

## нижняя точка – рекомбинантным HbCag

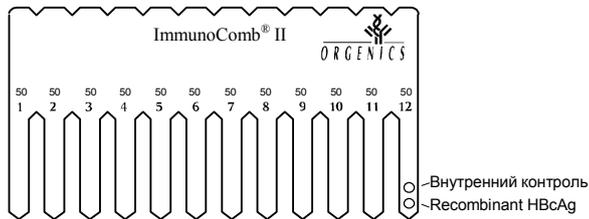


Рис.2. Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках, содержащих влагопоглотитель.

### Проявочные ванны

В наборе 3 Проявочных ванны. 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:

Ряд А	растворитель образца
Ряд В	промывочный раствор
Ряд С	моноклональные антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой (AP-конъюгат)
Ряд D	промывочный раствор
Ряд E	промывочный раствор
Ряд F	раствор хромогенного субстрата (окрашивающего вещества), содержащий 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)

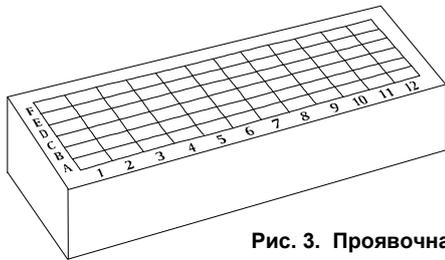


Рис. 3. Проявочная ванна

**Положительный Контроль** — 1 флакон (красная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, содержащей IgG антитела к HbCag.

**Отрицательный Контроль** — 1 флакон (зелёная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, отрицательной по антителам к HbCag.

**Разбавитель образца** — 1 флакон 5 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.

\* За исключением хранения для документации

- 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 90 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.
- Микропробирки или микротитратор с лунками.

#### Подготовка к анализу

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

#### Подготовка Проявочной ванны

- Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут; либо при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов. Перенесите необходимые для проведения анализа компоненты набора (Гребень, образцы, контроли, разбавитель образца) в помещение с комнатной температурой.
- 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 Гребня

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

- Разорвите пакет с Гребнем вдоль надсеченного края. Извлеките Гребень.
- 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 "50" 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.

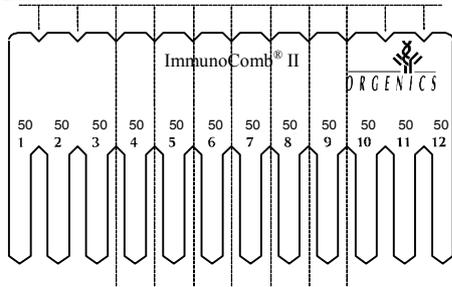


Рис. 4 Разделение Гребня

## Инструкция по проведению анализа

### Предварительная обработка образцов и контролей.

1. Для каждой образца и контроля введите по 90 мкл разбавителя образца в микропробирку или лунку микротитратора.
2. В каждую микропробирку или лунку добавьте 10 мкл образца или контроля. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.

### Реакция Антиген-Антитело (Ряд А)

3. 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.
4. 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.
5.
  - a. Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание:** Вынимайте и вновь вставляйте Гребень в лунки (несколько раз).
  - b. Оставьте Гребень в лунках ряда А и выдержите ровно 60 минут. Включите таймер. За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
  - c. По истечении 60 минут извлеките Гребень из ряда А. **Удалите оставшиеся капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня** фильтровальной бумагой. Не касайтесь передней части поверхности зубцов.

### Первая промывка (Ряд В)

6. Вставьте Гребень в лунки ряда В. **Прополощите:** энергично вынимайте и вставляйте Гребень в лунки в течение 10 секунд для более тщательной промывки. Повторите прополаскивание несколько раз в течение 2 минут; между тем проколите фольгу лунок ряда С. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости** как на этапе 5с

### Связывание с Конъюгатом (Ряд С)

7. Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Помешайте** как на этапе 5а. Включите таймер на 20 минут. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 20 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

### Вторая промывка (Ряд D)

8. Введите Гребень в лунки ряда D. **Прополощите** в течение 2 минут, как на этапе 6. Тем временем проколите фольгу в лунках ряда E. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

### Третья промывка (Ряд E)

9. Вставьте Гребень в лунки ряда E. **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)

10. Вставьте Гребень в лунки ряда F. **Перемешайте**. Включите таймер на 10 минут. Через 10 минут извлеките Гребень.

### Остановка реакции (Ряд E)

11. 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 можете 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 инструкцию обратно в оригинальную упаковку набора. Храните при температуре 2–8°C.

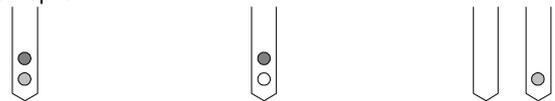
## Результаты анализа

### Достоверность

Для подтверждения правильной работы теста и достоверности полученных результатов необходимо соблюдение трёх условий (см. Рис.5):

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 слабоокрашенная 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.



Положительный контроль

Отрицательный контроль

Недействительный результат

Рис. 5 Подтверждение достоверности теста

## Качественная интерпретация результатов

### Визуальная интерпретация.

Сопоставьте интенсивность окрашивания **нижней** точки каждого образца с интенсивностью окрашивания **нижней** точки на зубце с **Положительным** Контролем. (Рис.6).

- Точка с интенсивностью окрашивания **большей или равной** интенсивности окрашивания нижней точки Положительного Контроля указывает на **наличие** IgG антител к core-антигену ВГВ (HВсAg).
- Отсутствие точки или точка с **меньшей** интенсивностью окрашивания, чем точка Положительного Контроля интерпретируется как **отрицательный** результат.



Отрицательный результат

Положительный контроль

Присутствуют IgG антитела к HВсAg

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.

Если точка исследуемого образца только немного слабее по интенсивности окраски, чем точка Положительного контроля, рекомендуется повторить тест.

Может наблюдаться незначительное взаимодействие с сыворотками, положительными по HAV IgM.

### Показатели качества теста\*

Чувствительность и специфичность тест-системы ImmunoComb® II HBc IgG были проверены на панели из 886 образцов. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследования

Контрольный метод	ImmunoComb® II HBc IgG	
	положительная	Отрицательная
положительная	93	0
отрицательная	7	786

На основании этих данных рассчитаны следующие показатели качества:

Чувствительность - 100%

Специфичность – 99.1%

### Повторяемость

Произвольно было выбрано 10 Гребней из разных наборов одной серии. Одна положительная по HBc IgG сыворотка была проверена 12 раз на каждом из выбранных Гребней. Каждый раз результат анализа был положительным.

### Воспроизводимость

3 положительных образца было проверено 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 HBsAg или антителам к нему, были незначительными. Перекрёстные реакции с образцами, положительными по ВИЧ, вирусу Краснухи, вирусу Гепатита С, Токсоплазме, ЦМВ были несущественными.

### 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. Cadranet, J.F., Caron, C., Collet, G., Van Batten, C., Dumouchel, P. (1999) Hepatitis B: epidemiology, natural history, biology, treatment monitoring. Phatol Biol (Paris). 47(9): 917-927.
2. Hollinger, F.B., Lemon, S.M., Margolis, H.S., eds. (1991) Viral hepatitis and liver disease. Baltimore: Williams and Wilkins.
3. Mahoney, F.J. (1999) Update on diagnosis, management and prevention of Hepatitis B virus infection. Clin Microbiol Rev 12(2): 351-366.
4. Milich, D.R. (1997) Pathobiology of acute and chronic hepatitis B virus infection: an introduction. J Viral Hepat 4 Suppl 2: 25-30.
5. Pirovino, M. (1998) Hepatitis B: clinical manifestations, diagnosis and medical management. Soz Praventivmed 43 Suppl 1: S 14-17, S 88-91.
6. Sjogren, M.H. (1994) Serologic diagnosis of viral hepatitis. Gastroenterol Clin North Am 23(3): 457-477.
7. Weston, S.R., Martin, P. (2001) Serological and molecular testing in viral hepatitis: an update. Can J Gastroenterol 15(3): 177-184.
8. Zuckerman, A., Zuckerman, J., Harrison, T. (1993) Viral hepatitis – the alphabet so far. Virus and Life. 6: 2-8.

\_\_\_\_\_ \*  
 Подробные данные предоставляются по требованию.

### Условные обозначения

	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контроль
	Отрицательный Контроль
	Перфоратор
	Разбавитель образца
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы
	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
	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.

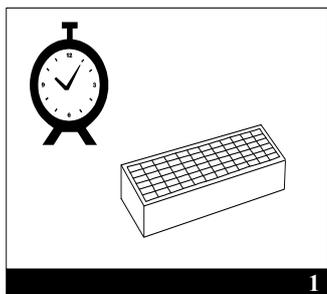
тел/факс: +7 (812) 325 21 70

http://www.biograd.ru

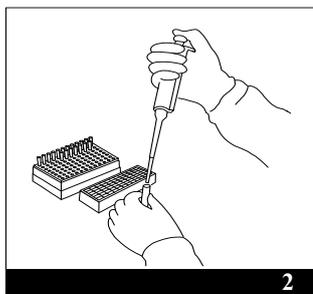
biograd@biograd.ru

<p>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</p>	<p></p> <p>MedNet GmbH                  Borkstrasse 10                  48163 Muenster - Germany                  Tel: + 49 251 32266-0                  Fax: + 49 251 32266-22</p> <p><b>Version: 60450002/R5/OR/CE (03/2009)</b></p>

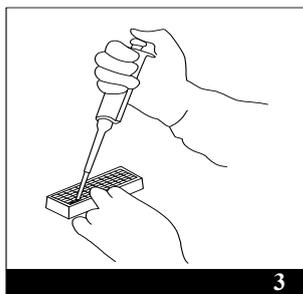
## Описание основных этапов теста



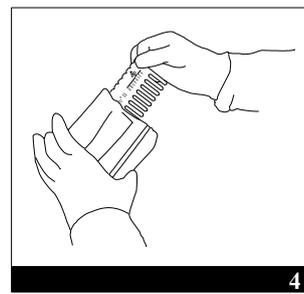
**1**  
Подготовка Проявочной ванны: выдержать 3 часа при комнатной температуре; или 20 мин. при 37°.



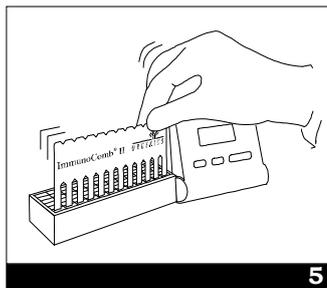
**2**  
Забор и разведение образцов и контролей



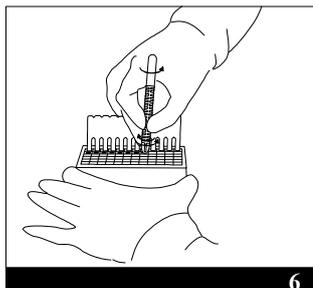
**3**  
Внесение разбавленных образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание.



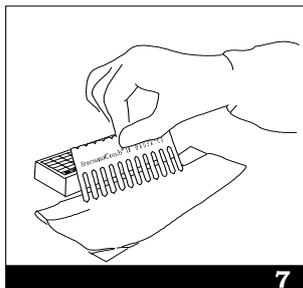
**4**  
Извлечение Гребня из упаковки.



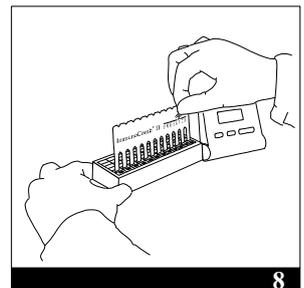
**5**  
Введение Гребня в лунки ряда А Проявочной ванны. Перемешивание. Инкубация.



**6**  
Вскрытие лунок ряда В перфоратором.

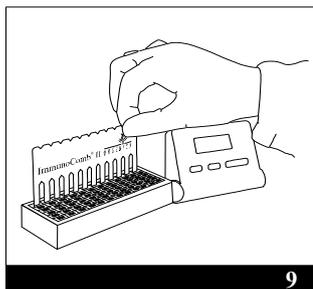


**7**  
Удаление оставшихся капель жидкости с заостренных концов зубцов Гребня

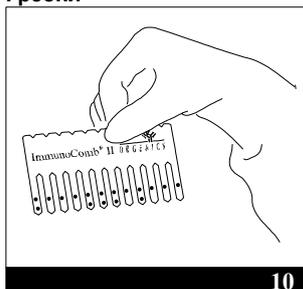


**8**  
Введение Гребня в лунки ряда В. Перемешивание. Инкубация.

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



**9**  
Цветная реакция в ряду F



**10**  
Результаты

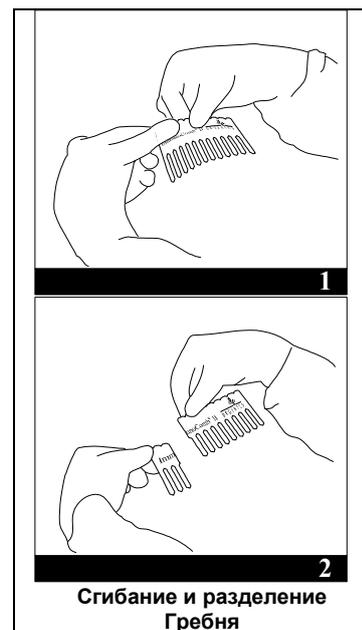
### Краткое руководство по проведению анализов

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

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов, довести все необходимые компоненты набора до комнатной температуры. Проводить анализ при комнатной температуре (22-26°C).
2. Предварительно разведите по 10 мкл каждого образца и контроля 90 мкл разбавителя образцов.
3. Внесите 25 мкл каждого разведенного образца или контроля в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
4. Вставьте Гребень в лунки ряда А и продолжайте анализ в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Этап	Ряд	Действия
Реакция Антиген-Антитело	A	Перемешайте; инкубация <b>60</b> мин., удалите капли жидкости
Промывка	B	Прополоскайте; инкубация <b>2</b> мин; удалите капли жидкости
Связывание с конъюгатом	C	Перемешайте; инкубация <b>20</b> мин; удалите капли жидкости.
Промывка	D	Прополоскайте; инкубация <b>2</b> мин; удалите капли жидкости
Промывка	E	Прополоскайте; инкубация <b>2</b> мин; удалите капли жидкости
Цветная реакция	F	Перемешайте, инкубация <b>10</b> мин жидкости.
Остановка реакции	E	Инкубация <b>1</b> мин.; сушка на воздухе.



**1**  
**2**  
Сгибание и разделение Гребня