

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор  
ООО «Био-Рад Лаборатории»

Бобровицкая Е. В.



2010 г.

**Инструкция по применению  
изделия медицинского назначения**

**«Тест-системы Монолиза (Monolisa) для  
in vitro диагностики вирусных гепатитов В и С».**

**BIO-RAD**

## МОНОЛИЗА® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА

(1 планшет) – 96 тестов 72556

(5 планшетов) – 480 тестов 72558

**Тест-система иммуноферментная для выявления капсидного антигена и антител против белков вируса гепатита С, в сыворотке (плазме) крови человека**

Для использования в диагностике In Vitro

**IVD**

**Контроль качества производителя**

*Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья, и до продажи продукта пользователю.*

*Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям.*

*Сведения о продукции и контроле каждой серии хранятся в компании БИО-РАД (BIO-RAD).*

**ООО «Био-Рад Лаборатории»**

**125167 Москва, Ленинградский пр-т., 37А, корп. 14**

**Бизнес-центр «Западный мост»**

**Тел.: (495) 7211404, Факс:(495) 7211412, post @ bio-rad.ru**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. НАЗНАЧЕНИЕ АНАЛИЗА.....                                           | 3  |
| 2. ПРИНЦИП МЕТОДА.....                                               | 3  |
| 3. СОСТАВ НАБОРА .....                                               | 4  |
| 4. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ<br>В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ ..... | 5  |
| 5. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.....                                         | 5  |
| 6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....                                        | 6  |
| 7. ОБРАЗЦЫ .....                                                     | 7  |
| 8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ,<br>УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ..... | 8  |
| 9. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.....                                 | 9  |
| 10. НАСТРОЙКА ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕСТА.....                 | 10 |
| 11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....                            | 10 |
| 13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА.....                                        | 12 |
| 14. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА .....                                         | 17 |
| 15. ЛИТЕРАТУРА .....                                                 | 17 |

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Тест-система Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА предназначена для иммуноферментного анализа с целью выявления вируса гепатита С. Метод основан на выявлении капсидного антигена и антител, присутствующих у больных гепатитом С в сыворотке и плазме крови.

## 2. ПРИНЦИП МЕТОДА

В составе тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» в качестве иммуносорбента используется планшет, в лунках которого фиксируются:

- Моноклональные антитела к капсидному белку вируса гепатита С,
- 2 рекомбинантных белка, вырабатываемых *E. coli*, соответствующие NS3 антигенам вируса генотипов 1и 3а.
- Один рекомбинантный белок, соответствующий неструктурному антигену NS4.
- Модифицированный пептид иммуно-доминантного эпитопа белка оболочки ВГС.

Используются следующие конъюгаты:

- Конъюгат 1 (R6): Мышиные биотинилированные моноклональные антитела к белковой оболочке вируса гепатита С, не вступающие в реакцию с модифицированным капсидным пептидом иммуносорбента.
- Конъюгат 2 (R7): мышиные антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой и комплекс стрептавидин - пероксидаза

Процедура анализа включает следующие этапы:

- 1) Внесение в лунки конъюгата 1, исследуемых проб и контрольных образцов сыворотки. При наличии антител к вирусу гепатита С они связываются с фиксированными на твердой фазе антигенами. При наличии капсидных антител к вирусу гепатита С в исследуемой сыворотке они связываются с антигенами иммуносорбента. Если в сыворотке присутствует капсидный антиген вируса он связывается с фиксированными в лунках моноклональными антителами и с биотинилированными моноклональными антителами к капсидному антигену гепатита С в составе конъюгата 1.
- 2) После инкубации в течение 90 минут при температуре 37 °С и процедуры промывки в лунки добавляется конъюгат 2, который включает в себя меченые пероксидазой антитела к человеческим антигенам и стрептавидин-пероксидазный комплекс. Стрептавидин/пероксидаза конъюгата 2 взаимодействует с биотинилированными моноклональными антителами к капсидному антигену гепатита С в случае их наличия. Антитела против человеческого IgG в составе конъюгата взаимодействует с анти-ВГС антителами в случае их наличия в исследуемом образце.
- 3) После инкубационного периода длительностью 30 минут при температуре 37 °С не связавшийся конъюгат удаляется промывкой, а комплекс антиген-антитело выявляется в результате ферментной реакции после добавления субстрата.
- 4) Через 30 минут реакцию останавливают. Оптическая плотность определяется спектрофотометром на волне 450/620-700 нм. Оптическая плотность образца позволяет сделать вывод о наличии или отсутствии антител к ВГС и/или капсидных антигенов вируса. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству антител к ВГС или антигенов, взаимодействовавших с иммуносорбентом.

### 3. СОСТАВ НАБОРА

| Метка                                     | Реагент                                                                                                                                                                                                                                                      | Форма выпуска           |                         |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                           |                                                                                                                                                                                                                                                              | 72556                   | 72558                   |
|                                           |                                                                                                                                                                                                                                                              | 96 тестов               | 480 тестов              |
| R1                                        | Иммуносорбент – разборный планшет 12 стрипов по 8 лунок, в которых фиксированы моноклональные антитела к капсидному антигену ВГС, очищенные рекомбинантные антигены и модифицированный пептид, соответствующий капсидному антигену ВГС                       | 1                       | 5                       |
| R2                                        | Промывочный раствор (x20)<br>20-ти-кратный концентрат - Трис NaCl буфер, pH 7,4<br>Консервант: ProClin™ 300 (0,04 %)                                                                                                                                         | 1 флакон<br>70 мл       | 1 флакон<br>235 мл      |
| R3                                        | Отрицательная контрольная сыворотка<br>Трис HCl буфер, содержащий БСА<br>Консервант: ProClin™ 300 (0,1 %)                                                                                                                                                    | 1 флакон<br>1 мл        | 1 флакон<br>1 мл        |
| R4                                        | Положительная контрольная сыворотка<br>Человеческая сыворотка, содержащая антитела к ВГС, отрицательная по HBsAg и антителам к ВИЧ1 и ВИЧ2, растворенная в Трис HCl буфере, содержащем БСА. Инактивирована фотохимически<br>Консервант: ProClin™ 300 (0,1 %) | 1 флакон<br>1,5 мл      | 1 флакон<br>3 мл        |
| R5a                                       | Контрольный образец антигена (КАГ),<br>лиофилизированный, представляет собой синтетический белок, соответствующий капсидному антигену ВГС.                                                                                                                   | 1 флакон<br>sqf<br>1 мл | 1 флакон<br>sqf<br>1 мл |
| R5b                                       | Раствор для разведения КАГ<br>Водный раствор ProClin™ 300 (0,5 %)                                                                                                                                                                                            | 1 флакон<br>1 мл        | 1 флакон<br>1 мл        |
| R6                                        | Конъюгат 1<br>Мышьиные биотинилированные моноклональные антитела к белковой оболочке вируса гепатита С. Темно-красного цвета. Консервант: азид натрия (< 0,1 %), космоцил 0,025 %                                                                            | 1 флакон<br>15 мл       | 2 флакона<br>2 x 30 мл  |
| R7                                        | Конъюгат 2<br>Мышьиные антитела против человеческих IgG/пероксидаза и комплекс стрептавидин – пероксидаза. Зеленого цвета. Консервант: ProClin™ 300 (0,5 %)                                                                                                  | 1 флакон<br>15 мл       | 2 флакона<br>2 x 30 мл  |
| R8                                        | Субстратный раствор<br>Раствор лимонной кислоты и ацетата натрия, pH 4,0, содержащий H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,015 %) и DMSO (4 %)                                                                                                                    | 1 флакон<br>60 мл       | 2 флакона<br>2 x 60 мл  |
| R9                                        | Хромоген<br>Раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ)                                                                                                                                                                                                     | 1 флакон<br>5 мл        | 2 флакона<br>2 x 5 мл   |
| R10                                       | Стоп-РЕАГЕНТ<br>1 Н раствор серной кислоты (1 Н H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )                                                                                                                                                                             | 1 флакон<br>28 мл       | 3 флакона<br>3 x 28 мл  |
| Клейкая пленка для герметизации планшетов |                                                                                                                                                                                                                                                              | 4                       | 12                      |

#### 4. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Гипохлорит натрия (дезинфектант) и бикарбонат натрия.
- Фильтровальная бумага.
- Одноразовые перчатки.
- Защитные очки.
- Одноразовые пробирки.
- Автоматические или полуавтоматические пипетки на 50, 80, 100, 200 и 1000 мкл.
- Мерная посуда на 10, 200 и 1000 мл.
- Встряхиватель пробирок Вортекс.
- Автоматический\*, полуавтоматический\* или ручной промыватель для планшетов.
- Водяная баня или сухой термостат\* 37 °C ± 1 °C.
- Контейнер для контаминированных отходов.
- Фотометр для планшетов\* с фильтрами на 490,620,450/620 — 700 нм.

\* Для получения подробной информации о пригодности оборудования для выполнения теста обратитесь в техническую службу представительства компании.

#### 5. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Все включенные в набор реагенты предназначены для диагностики *in vitro*.

- При работе с реагентами и пробами пользуйтесь одноразовыми перчатками. После работы тщательно мойте руки.
- Для дозирования образцов и реагентов используйте только автоматические пипетки.
- Положительный контрольный образец R4 инактивирован фотохимически.
- Сыворотка человека, которая была использована для создания положительного контрольного образца (R4), была исследована, и в ней не было обнаружено поверхностного антигена гепатита В (HBs АГ), антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Поскольку не существует исследований, результаты которых способны гарантировать полное отсутствие возбудителей инфекционных болезней, с реагентами и пробами следует обращаться как с потенциально инфицированным материалом.
- Любое оборудование, находившееся в непосредственном контакте с пробами и реагентами человеческого происхождения, а также промывочные растворы следует считать инфицированными.
- Избегайте пролива биопроб и растворов, содержащих пробы.
- Поверхность должна быть промыта от пролитой жидкости 10% раствором гипохлорида натрия. Если разлита кислота, ее необходимо вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия и высушить промокательной бумагой. Материал, использованный для чистки следует выбрасывать в специальный контейнер для контаминированных отходов.
- Пробы и реагенты человеческого происхождения, также как и загрязненный материал должны быть утилизированы после деконтаминации.

- либо замачиванием в 5 % растворе гипохлорида натрия (1 часть раствора на 10 частей загрязненной жидкости или воды) в течение 30 минут;
  - или автоклавированием при 121 °С минимум в течение 2-х часов.
- Автоклавирование - лучший метод инактивации ВИЧ и вирусов гепатита В и С.

**ВНИМАНИЕ! НЕ ПОМЕЩАЙТЕ В АВТОКЛАВ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ**

- Не допускайте попадания на кожу и слизистые оболочки субстратного буфера, хромогена и стоп-раствора.
- Растворы, использованные для промывки планшета или любая жидкость, содержащая элементы биологической пробы, должны попадать в слив только после нейтрализации и автоклавирования.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Это вещество способно взаимодействовать со свинцовыми или медными трубами, образуя взрывоопасные азиды металлов. Чтобы предотвратить накопление азидов в трубах, перед сливом этих реагентов в канализацию они должны быть нейтрализованы, а раковина промыта большим количеством воды.
- Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество ProClin™ 300 (0,04; 0,1 или 0,5 %), которое может вызывать раздражение кожи и слизистых



R43: может вызывать раздражение кожи при контакте.

S28/37: после контакта с кожей промойте участок контакта большим количеством воды с мылом. При работе используйте защитные перчатки.

- Таблица данных по безопасности реагентов можно получить по дополнительному запросу

## 6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Качество результатов зависит от выполнения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices):

- Название тест-системы и специальный идентификационный номер указан на рамке каждого микропланшета. Идентификационный номер также указан на каждом стрипе.

**Монолиза ВГС Ag/Ат УЛЬТРА: Идентификационный (ID) номер = 55**

Перед использованием проверьте идентификационные номера на стрипах. Если он отсутствует или отличается от указанного выше, стрип для исследования использовать нельзя.

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте и не используйте в одном и том же исследовании реагенты из разных серий;

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11х, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными

растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 x голубого цвета или маркировка 10 x оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

- Перед использованием все реагенты необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут.
- При приготовлении реагентов избегайте возможности контаминации.
- Не проводите исследования в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или при сильном запылении воздуха в лаборатории так, как это может повлиять на ферментативную активность конъюгата.
- Используйте одноразовую лабораторную посуду, или, в крайнем случае, тщательно промытую и ополоснутую деионизированной водой.
- Не допускайте пересыхания содержимого лунок планшета между завершением промывки и внесением реагентов.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к металлам и их ионам. Не допускайте контакта металлических предметов с растворами, содержащими конъюгат или субстрат.
- Смесь для ферментативной реакции (субстратный раствор + хромоген) должна приобрести розовую окраску. Изменение розовой окраски в течение нескольких минут после приготовления смеси означает, что реагент не может быть использован и подлежит замене.
- Приготовление раствора для ферментативной реакции должно производиться в пластиковых одноразовых лотках или в стеклянных контейнерах, которые следует предварительно промыть 1N раствором HCl, тщательно прополоскать дистиллированной водой и высушить. Реагенты следует хранить в темноте.
- Используйте новые наконечники для раскапывания каждой сыворотки.
- Тщательная промывка принципиально важна для выполнения анализа. Соблюдайте рекомендованное количество промывок, следите, чтобы все лунки до краев заполнялись моющим средством и полностью опустошались. Несоблюдение правил промывки может привести к получению недостоверных результатов.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость для работы с конъюгатом и раствором для ферментативной реакции.

## 7. ОБРАЗЦЫ

Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранный с ЭДТА, гепарином, цитратом, антикоагулянтами на основе ACD). При отделении сыворотки или плазмы от сгустка крови или эритроцитов следует избегать гемолиза. Выраженный гемолиз может повлиять на результаты теста. Если в исследуемых образцах присутствуют посторонние включения, пробы следует отцентрифугировать перед проведением анализа. Присутствующие в образце частицы фибрина или сгустки могут давать ложноположительные результаты. Образцы должны храниться при +2 °C - +8 °C, если исследование будет выполняться не позднее 7 дней с момента взятия образца или при -20 °C при более длительном хранении.

Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Если необходимо транспортировать образцы, их следует упаковать в соответствии с действующими правилами транспортировки этиологических агентов. Рекомендуется перевозка в замороженном состоянии.

**НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННЫЕ, ГИПЕРЛИПЕМИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ С СИЛЬНЫМ ГЕМОЛИЗОМ.**

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Образцы, содержащие до 90 г/л альбумина, 50 мкг/мл биотина, 100 мг/л билирубина, липемические образцы с содержанием липидов до 36 г/л в эквиваленте триглицеридов, гемолизированные пробы, содержащие до 87 г/л гемоглобина, могут быть исследованы с достоверным результатом.

Отрицательные пробы, образцы, содержащие анти-ВГС антитела, и образцы, положительные по антигену ВГС, тестировались до и после воздействия температуры 56 °С с экспозицией 30 минут и после 3 циклов заморозки – оттаивания. Ни одно из воздействий на определение антител к ВГС не повлияло. Однако было показано, что тепловое воздействие значительно снижает способность тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» к определению антигенов.

## **8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ**

Перед началом использования выдержите реагенты тест-системы Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА в течение 30 минут при комнатной температуре.

### **1) Реагенты, готовые к применению**

#### **Планшет – иммуносорбент (R1)**

Каждый микропланшет состоит из 12 стрипов, установленных в рамке. Он упакован герметично в пакет, который снабжен замком-клипсой. Перед вскрытием упаковки выдержите планшет в пакете при комнатной температуре, во избежание появления конденсата в лунках планшета. Рассеките пакет ножницами или скальпелем на 0,5-1 см выше линии клипсы. Откройте его и достаньте планшет. Неиспользованные стрипы положите в пакет, запечатайте и храните при +2 – 8 °С.

#### **Конъюгат 1: готовый к применению (R6)**

Перед использованием гомогенизировать, переворачивая флакон.

#### **Конъюгат 2: готовый к применению (R7)**

Перед использованием гомогенизировать, переворачивая флакон

### **2) Подготовка рабочих растворов реагентов**

#### **Промывочный раствор R2 (x20)**

Для приготовления рабочей концентрации промывочного раствора концентрат (x 20) следует развести в отношении 1 : 20 дистиллированной водой. Для промывки 12 стрипов достаточно 800 мл промывочного раствора в рабочей концентрации.

#### **Раствор для ферментной реакции (R8 + R9)**

Развести хромоген ТМБ (R9) субстратным раствором (R8) в соотношении 1:11. Для получения объема, достаточного для проведения анализа в 12 стрипах, необходимо смешать 1 мл хромогена ТМБ и 10 мл субстратного раствора. Гомогенизировать.

#### **Контрольный образец антигена (R5a + R5b)**

Во флакон с лиофилизированным контрольным образцом антигена КАГ (R5a) добавить раствор для его разведения (R5b). Закрыть флакон и дать жидкости отстояться в течение 10 минут, время от времени аккуратно перемешивайте содержимое, переворачивая флакон и слегка взбалтывая.

### **3) Срок годности**

Набор следует хранить при +2-8 °С. При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе «Монолиза® Ag-HBs УЛЬТРА» может быть

использован до даты, указанной на упаковке.

**R1:** После вскрытия вакуумной упаковки стрипы можно использовать в течение 1-го месяца, сохраняя их в аккуратно запечатанном пакете.

**R2:** Разведенный промывочный раствор можно использовать в течение 2-х недель при  $+2 - 30^{\circ}\text{C}$ . Концентрат промывочного раствора может храниться при  $+2 - 30^{\circ}\text{C}$ .

**R5a + R5b:** Рабочий раствор положительного контроля антигена Приготовленный реагент может использоваться в течение одного месяца при хранении при температуре от  $+2$  до  $+8^{\circ}\text{C}$ , 2 месяцев при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  (выдерживает до 5 циклов замораживания/размораживания при  $-20^{\circ}\text{C}$ )

**R8 + R9:** После приготовления реагент может использоваться в течение 6 часов при комнатной температуре ( $18 - 30^{\circ}\text{C}$ ) в темном месте.

## 9. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 1) Строго следуйте предложенной процедуре анализа.
- 2) Для оценки правильности выполнения теста и результатов анализа используйте контрольные образцы в каждой постановке теста.
- 3) Необходимо соблюдать принципы лабораторной диагностики (Good Laboratory Practice):

### Методика

- 1) Тщательно подготовьте идентификацию проб и их распределение на планшете.
- 2) Подготовьте необходимое количество промывочного раствора в рабочей концентрации (R2) и раствор контрольного образца антигена для (R5a + R5b).
- 3) Достаньте из упаковки стрипы планшета (R1) и установите их в рамку.
- 4) Не промывая предварительно планшет, внесите реагенты в лунки в следующей последовательности (согласно плану распределения образцов на планшете):
  - 4.1 100 мкл конъюгата 1 (R6) в каждую лунку
  - 4.2 50 мкл отрицательного контрольного образца (R3) в лунку A1;  
50 мкл положительного контрольного образца (R4) в лунки B1, C1, D1;  
50 мкл рабочего раствора контрольного образца антигена (R5a + R5b) в лунку E1;  
50 мкл первой пробы в лунку F1,  
50 мкл второй пробы в лунку G1 и т. д.

Гомогенизируйте содержимое лунок с помощью микропипетки (не менее, чем три аспирации) или шейкерованием планшета (в течение 5 секунд).

Если внесение проб занимает свыше 10 минут, то положительный и отрицательный контрольный образец рекомендуется внести после исследуемых сывороток.

В зависимости от используемого оборудования расположение контрольных образцов и порядок их внесения в лунки микропланшета может быть изменен.

**ВНИМАНИЕ!** Правильность внесения контрольных и исследуемых сывороток контролируют визуально, по изменению цвета содержимого лунки с пурпурного на синий, или фотометрически, используя длину волны 620 нм (подробную информацию см. в разделе 12 «СПЕКТРОФОТО-МЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ПРОБ И РЕАГЕНТОВ»).

- 5) Герметизируйте стрипы планшета клейкой пленкой, прижимая ее по всей площади

поверхности стрипов, для достижения лучшей герметичности.

- 6) Инкубируйте планшет в водяной бане с регулируемой температурой или в сухом инкубаторе в течение  $90 \pm 5$  минут при температуре  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .
- 7) Удалите клейкую пленку. Тщательно удалите содержимое лунок в контейнер для контаминированных отходов и добавьте в каждую лунку не менее чем 0,370 мл промывочного раствора. Снова удалите содержимое. Повторите эту процедуру еще не менее 4 раз (всего должно быть 5 промывок). Величина остаточного объема в лунках должна быть менее 10 мкл (при необходимости просушите стрипы с помощью фильтровальной бумаги).
- 8) Быстро внесите во все лунки 100 мкл раствора конъюгата 2 (R7). Перед использованием аккуратно взболтайте флакон. Герметизируйте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте планшет в течение  $30 \pm 5$  минут при температуре  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . **ВНИМАНИЕ!** Конъюгат окрашен в зеленый цвет. Наличие в лунке конъюгата 2 можно определить спектрофотометрически при длине волны 620 нм (подробную информацию см. в разделе 12 «СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ПРОБ И РЕАГЕНТОВ»)
- 9) Удалите клейкую пленку, удалите содержимое лунок и промойте их 5 раз в соответствии с приведенным выше описанием.
- 10) Приготовьте раствор для ферментной реакции (см. раздел 8, реагент (R8 + R9)).
- 11) Быстро внесите в каждую лунку 80 мкл свежеприготовленного раствора для ферментной реакции (R8 + R9). Реакция должна происходить в темном месте при комнатной температуре ( $18 - 30^\circ\text{C}$ ) в течение  $30 \pm 5$  минут. Во время инкубации клейкую пленку не используйте.  
*ПРИМЕЧАНИЕ. На этой стадии протокола внесение окрашенного в розовый цвет раствора для ферментативной реакции может контролироваться визуально. Пустые и заполненные розовым раствором лунки имеют отчетливо различающиеся цвета. (Подробную информацию см. в разделе «Спектрофотометрическая верификация внесенных проб и реагентов»)*
- 12) Добавьте 100 мкл стоп-реагента (R10) во все лунки, в той же последовательности и с той же скоростью, что и раствор субстрата. Гомогенизируйте смесь.  
*ПРИМЕЧАНИЕ. На данной стадии исследования внесение неокрашенного стоп-реагента можно контролировать визуально. После внесения стоп-реагента розовая окраска субстрата исчезает (в случае отрицательного результата) или переходит от синей до желтой (в случае положительного результата).*
- 13) Тщательно протрите основание планшета. Подождите минимум 4 минуты после добавления стоп-реагента и только после этого проводите измерение оптической плотности при 450/620-700 нм, используя фотометр для планшетов. Измерение можно проводить в период до 30 минут после остановки реакции.
- 14) Проверьте соответствие между спектрофотометрическими и визуальными данными, а также между распределением проб в планшете и идентификационным протоколом.

## 10. НАСТРОЙКА ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕСТА

**ВНИМАНИЕ:** Аккуратное и тщательное выполнение процедуры промывки обеспечивает максимальную эффективность теста. В ряде случаев, если это необходимо, следует оптимизировать процедуру промывки (увеличить количество циклов или объем промывочного раствора в каждом цикле) с целью достижения приемлемых значений оптической плотности для отрицательного контрольного образца.

## 11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наличие или отсутствие антител к ВГС и/или капсидного антигена ВГС определяется для каждого образца при сопоставлении зарегистрированной оптической плотности с

расчетным пороговым значением.

## 1. Расчет средней оптической плотности положительных контрольных образцов (ОП R4)

Пример: положительный контрольный образец R4

| Лунка | Оптическая плотность |
|-------|----------------------|
| B1    | 1,636                |
| C1    | 1,704                |
| D1    | 1,650                |
| Сумма | 4,990                |

Средняя ОП R4 = (Сумма оптических плотностей (R4)) / 3 = 4,990 / 3 = 1,663

## 2. Вычисление порогового значения (СО, ОП крит.)

ОП крит. = (Средняя ОП R4) / 4

Пример: (средняя ОП R4) = 1,663

ОП крит. = 1,663 / 4 = 0,415

## 3. Критерии оценки достоверности анализа

а) Для отрицательного контрольного образца (R3): значение оптической плотности должно быть меньше (ОПкрит. x 0,6).

б) Для положительной контрольной сыворотки (R4):

Значение средней оптической плотности должно быть больше или равно 0,800 и меньше или равно 2,400.

Если одно из значений положительного контрольного образца (R4) более чем на 30 % отличается от среднего значения, этим результатом следует пренебречь и произвести повторный расчет, основываясь на двух остальных контрольных значениях.

в) Для раствора контрольного образца антигена (R5a + R5b):

Значение оптической плотности должно быть больше 0,500.

Результаты теста считаются недостоверными, если результаты для отрицательной контрольной сыворотки (R3), раствора контрольного образца антигена (R5a + R5b) или более чем одной пробы с положительной контрольной сывороткой (R4) не укладываются в указанные выше пределы.

## 4. Интерпретация результатов

Образцы с оптической плотностью ниже порогового значения считаются отрицательными в анализе с использованием тест-системы «Монолиза® ВГС Ag – Ат УЛЬТРА».

Результаты незначительно ниже порогового значения (ОП крит. – 10 % < ОП пробы < ОП крит.) должны быть, однако, интерпретированы осторожно (рекомендуется повторно исследовать соответствующие пробы).

Образцы с оптической плотностью выше или равной порогового значения изначально считаются положительными и перед окончательной интерпретацией должны исследоваться повторно в парных пробах.

После повторного исследования образец считается положительным в тесте «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА», если обе пробы продемонстрировали положительный результат, то есть величины оптической плотности обеих проб были выше или равны пороговому значению. Образец считается отрицательным, если оптическая плотность обеих проб ниже порогового значения.

## 12. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ПРОБЫ И РЕАГЕНТОВ (ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА)

### Верификация на первом этапе: Наличие конъюгата 1 (R6) и ОБРАЗЦА

Наличие конъюгата 1 (R6) и образца в лунке планшета может быть проконтролировано фотометрически при регистрации ОП на волне 620 нм.

Оптическая плотность каждой лунки, содержащей пробу и конъюгат, должна превышать 0,800.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** После внесения пробы конъюгат 1 (R6) изменяет цвет с пурпурного на синий.

### Верификация на втором этапе: наличие конъюгата 2 (R7)

Конъюгат 2 (R7) окрашен в зеленый цвет.

Наличие конъюгата 2 (R7) может быть проконтролировано фотометрически при регистрации ОП на волне 620 нм.

Величина оптической плотности каждой лунки должна превышать 0,300 (меньшее значение свидетельствует о внесении недостаточного объема конъюгата 2).

### Верификация внесения раствора для ферментной реакции (R8 +R9)

Контроль наличия в лунке раствора для ферментативной реакции, окрашенного в розовый цвет, может производиться фотометрически при регистрации ОП на волне 490 нм. Величина оптической плотности лунки с внесенным раствором должна превышать 0,100 (меньшее значение оптической плотности свидетельствует о внесении недостаточного объема раствора для ферментной реакции).

Лунки, после внесения раствора субстрата, окрашенного в розовый цвет, визуально значительно отличаются от пустых лунок.

## 13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

### А. ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Для определения специфичности тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» исследовались образцы крови доноров и пациентов в рамках ежедневной практики нескольких лабораторий.

#### Специфичность теста при исследовании доноров

Исследования проходили в трех различных Центрах крови. Изучались образцы, полученные как от первичных доноров, так и при повторных кроводачах.

| Центр крови                         | Руни,<br>Франция | Бордо,<br>Франция | Монпелье,<br>Франция | Всего |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|----------------------|-------|
| Количество исследованных проб       | 2410             | 2503              | 2248                 | 7161  |
| Количество повторно реактивных проб | 5                | 3                 | 4                    | 12    |

Было установлено, что из 7161 образцов 12 проб оказались положительными в повторном исследовании. Тестирование и интерпретация результатов производилась в

соответствии с инструкцией к применению тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА». Подтверждение полученных положительных результатов с помощью иммуноблота или ПЦР не производилось.

В исследованиях доноров специфичность теста составила 99,83 % (99,71 % - 99,91 % с 95 % доверительным интервалом).

#### **Специфичность при исследовании госпитализированных пациентов**

От пациентов двух лечебных учреждений было отобрано 469 образцов сыворотки, которые исследовались параллельно с помощью тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» и антительного ИФА теста. Данные тестирования совпадали в 462 случаях: 440 образцов были определены как отрицательные, 22 пробы – как положительные в обоих тестах. 21 положительный результат был подтвержден с помощью иммуноблота «Десискан ВГС ПЛЮС», в одном случае результат блота интерпретировали как вероятно положительный.

Для 7 сывороток результаты, полученные с помощью «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА», антительного теста, иммуноблота «Десискан ВГС ПЛЮС» и ПЦР, не совпадали:

**Результаты анализа этих образцов были следующие:**

2 образца, выявленные как положительные в антительном тесте, были определены как отрицательные в тестах «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА», «Десискан ВГС ПЛЮС» и ПЦР. Результаты антительного теста были интерпретированы как ложноположительные.

По двум образцам заключение не было сделано, так как результат ПЦР анализа не поддавался интерпретации. Они были исключены из дальнейших исследований.

Один образец, выявленный как положительный антительном тесте, в тесте «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» и в ПЦР продемонстрировал отрицательный результат. Иммуноблот «Десискан ВГС ПЛЮС» показал неопределенный результат.

Только два образца, определенные как положительные и в тесте «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» (с низким коэффициентом реактивности менее 1,7) и в тесте на анти-ВГС антитела были отрицательными в ПЦР и дали неопределенный результат в иммуноблот «Десискан ВГС ПЛЮС» (NS4 – слабовыраженная полоса).

Рассчитанная на основании данного исследования специфичность составила 99,5 % (443/445), если последние два образца оценивать как ложноположительные, и 100 %, если считать их истинно положительными: серологическая картина ранее перенесенной инфекции с остаточным количеством антител (неопределенный результат в иммуноблоте).

#### **Специфичность при исследовании образцов с высокой вероятностью ложноположительного результата**

Было исследовано 429 образцов, которые потенциально могли продемонстрировать неспецифические перекрестные иммунные реакции в тесте. Пробы были отобраны:

- у пациентов, страдающих различными инфекционными заболеваниями, например, гепатитами А и В, краснухой, токсоплазмозом, инфекционным паротитом, корью, герпесом, болезнью Шагаса, у больных, инфицированных цитомегаловирусом, вирусом Эпштейна - Барра, вирусом Варицелла - Зостер, вирусом клеточной лейкемии I, ВИЧ, флавивирусом и пациентов, вакцинированных от гриппа.
- у пациентов с обнаруженным ревматоидным фактором,
- у страдающих аутоиммунными заболеваниями (системной красной волчанкой), миеломой, с положительными пробами на человеческие антитела к мышечным антигенам и к кардиолипину.

- у беременных, у больных циррозом, хронической почечной недостаточностью и пациентов, находящихся на гемодиализе.

Из указанных 429 образцов была выявлена только одна реактивная проба в тесте «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА». Тест-система на антитела к вирусу гепатита С также показала положительный результат.

Последующий анализ сложных сывороток продемонстрировал специфичность теста 100 % (428/428).

## Б. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Чувствительность тест-системы оценивалась при тестировании большого количества положительных образцов, коммерческих сероконверсионных панелей, стандартов компании Био-Рад и экспертных центров. Объединенные результаты исследований приведены ниже.

**Чувствительность при исследовании образцов с подтвержденным содержанием вируса гепатита С**

Всего было исследовано 646 положительных образцов от пациентов, страдающих хронической формой гепатита С, что обуславливало наличие анти-ВГС антител в сыворотке. Среди исследуемых проб присутствовало 405 генотипированных. Все 646 образцов показали высокую реактивность в тесте «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА». Чувствительность составила 100 %.

**Чувствительность при исследовании образцов, содержащих различные генотипы вируса.**

Всего было исследовано 405 генотипированных образцов: 133 из них были генотипированы в различных учреждениях, а 272 — в госпитальных лабораториях.

Распределение по генотипам отражено в таблице ниже.

| Генотип    | 1a   | 1b | 1c | 1d | 1a/b | 2  | 2a | 2b | 2c   | 2i | 2a/c | 3  | 3a          | 3b            |       |
|------------|------|----|----|----|------|----|----|----|------|----|------|----|-------------|---------------|-------|
| Количество | 53   | 83 | 2  | 3  | 3    | 31 | 7  | 18 | 4    | 1  | 17   | 25 | 77          | 1             |       |
| Генотип    | 3a/b | 4  | 4a | 4c | 4d   | 4h | 4k | 4f | 4c/d | 5a | 6a   | 6d | 1b,<br>2a/2 | 1a/b,<br>2a/c | Всего |
| Количество | 2    | 10 | 21 | 6  | 5    | 2  | 2  | 3  | 1    | 24 | 1    | 1  | 1           | 1             | 405   |

Все образцы были оценены как положительные. Чувствительность составила 100 %.

### Образцы, полученные у пациентов в острый период инфекции

Чувствительность теста исследовали на образцах, соответствующих острой (начальной) стадии инфекции. С использованием тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» исследовалось 53 сероконверсионных панели, состоящих из 421 образца. Результаты сопоставляли с данными, полученными при исследовании образцов в антительном тесте. Использование тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» позволило раньше выявить маркеры инфекции практически на всех панелях: было выявлено на 119 образцов больше в сравнении с детекцией набором для определения анти-ВГС антител.

|                                         |                                     |                                |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 53 сероконверсионные панели (421 проба) | набор для определения антител к ВГС | «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» |
| Количество положительных проб           | 152                                 | 271                            |

Из 53 сероконверсионных панелей 11 начинались образцами, не содержащими маркеры вируса, что позволило более точно оценить свойства тест-системы в фазу

серологического окна (в отсутствие анти-ВГС антител).

| Панель         | Генотип | Время, требующееся на определение положительного результата, с момента взятия первой пробы (в днях) |                |                              | Разница между набором для определения антигенов к ВГС и тест – системой Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА (в днях) |
|----------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                |         | РНК ВГС **                                                                                          | Набор анти-ВГС | Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА |                                                                                                               |
| BCP-6211       | 1a      | 140                                                                                                 | 186            | 140                          | 46                                                                                                            |
| BCP-6213       | 1a      | 11                                                                                                  | 43             | 30                           | 13                                                                                                            |
| BCP-6222       | 1a      | 17                                                                                                  | 40             | 17                           | 23                                                                                                            |
| BCP-6225       | 1a      | 45                                                                                                  | 78             | 45                           | 33                                                                                                            |
| BCP-6227       | 1a      | 42                                                                                                  | 74             | 46                           | 28                                                                                                            |
| BCP-9041       | 1a      | 24                                                                                                  | 62             | 24                           | 38                                                                                                            |
| BBI-PHV919     | 1a      | 25                                                                                                  | 28             | 28                           | 0                                                                                                             |
| BCP-9054       | 3a      | 52                                                                                                  | 60             | 52                           | 8                                                                                                             |
| BCP-9055       | NG*     | 31                                                                                                  | 68             | 33                           | 35                                                                                                            |
| BCP-6216       | NG*     | 23                                                                                                  | 23             | 23                           | 0                                                                                                             |
| NABI-SC90      | NG*     | 10                                                                                                  | 52             | 10                           | 42                                                                                                            |
| Среднее в днях |         | 38,2                                                                                                | 64,9           | 40,7                         | 24,2                                                                                                          |

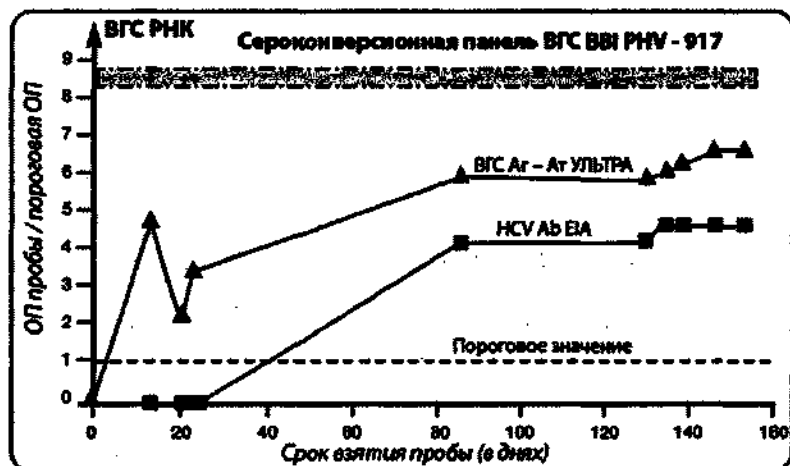
\* Генотипирование не производилось

\*\* Результаты теста РНК предоставлены поставщиками панели.

На 11 панелях тест-системой «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» маркеры вируса гепатита С выявлялся в среднем на 24 дня раньше, чем в антительном тесте. Преимущество тест-системы «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» связано с методикой совместного определения анти-ВГС антител и капсидного антигена.

#### Чувствительность по антигену

Чувствительность при определении антигена определялась, главным образом, при исследовании некоторых сероконверсионных панелей, например BBI 917. Ниже приводятся графики сравнительной чувствительности тестов «Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА» и антительного теста.



\* HCV Ab EIA – ИФА тест для определения анти-ВГС антител

### Исследование воспроизводимости

Исследования воспроизводимости результатов в одном исследовании и между исследованиями проводились на 7 образцах: одном отрицательном, 3 пробах, содержащих анти-ВГС антитела и 3 пробах, содержащих антиген.

Для оценки внутрисерийной воспроизводимости образцы тестировались в 30 повторах в одной постановке.

Для оценки межсерийной воспроизводимости образцы тестировались двумя лаборантами в течение 20 дней (в соответствии с процедурой NCCLS EP5).

Среднее значение коэффициентов реактивности, стандартное отклонение, и коэффициент вариации (CV %) приведенные в таблицах.

Таблица 1. Внутрисерийная воспроизводимость

| Образцы                      | Среднее значение | Стандартное отклонение | CV % |
|------------------------------|------------------|------------------------|------|
| Отрицательные                | 0,14             | 0,01                   | 6,1  |
| ВГС Ат слабо положительные   | 1,12             | 0,04                   | 3,65 |
| ВГС Ат средние положительные | 2,39             | 0,08                   | 3,39 |
| ВГС Ат резко положительные   | 4,88             | 0,18                   | 3,7  |
| Аг слабopоложительные        | 1,14             | 0,03                   | 3,04 |
| Аг среднеположительные       | 1,97             | 0,06                   | 3,02 |
| Аг резко положительные       | 5,86             | 0,14                   | 2,38 |

Рассчитанные на основании исследования 6 положительных образцов коэффициенты вариации составили менее 10 %.

Таблица 2. Межсерийная воспроизводимость

| Образцы                     | Среднее значение | Стандартное отклонение | CV % |
|-----------------------------|------------------|------------------------|------|
| Отрицательные               | 0,16             | 0,02                   | 12,4 |
| ВГС Ат слабо положительные  | 1,2              | 0,08                   | 6,65 |
| ВГС Ат средне положительные | 2,39             | 0,13                   | 5,38 |
| ВГС Ат резко положительные  | 4,77             | 0,17                   | 3,58 |
| Аг слабоположительные       | 1,13             | 0,09                   | 7,97 |
| Аг среднеположительные      | 2,0              | 0,15                   | 7,73 |
| Аг резко положительные      | 5,99             | 0,37                   | 6,2  |

Рассчитанные на основании исследования 6 положительных образцов коэффициенты вариации составили менее 15 %.

#### 14. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Учитывая разнообразие иммунологических реакций больных, инфицированных вирусом гепатита С, особенно в период сероконверсии, могут наблюдаться некоторые различия между тестами в выявлении инфекции. Несовпадение результатов обусловлено различиями в используемых антигенных белках. Отрицательный результат в скрининговом тесте не исключает возможность наличия носительства или инфекции вирусного гепатита С.

При использовании любой методики ИФА возможно получение ложноположительных результатов. Рекомендуется подтвердить результат для любого повторно положительного образца методом, соответствующим критериям интерпретации тест-системы Монолиза® ВГС Аг – Ат УЛЬТРА — используя скрининговый ИФА тест для определения антител или иммуноблот. При необходимости возможно использование методов определения РНК вируса гепатита С или специфичного теста на антиген ВГС в совокупности с реакцией нейтрализации.

Колориметрический метод оценки осаждения проб, конъюгата и рабочего ферментативного раствора не позволяет судить о величине внесенного объема. Он позволяет лишь качественно оценить наличия в лунках пробы, конъюгата или раствора для ферментативной реакции. Вероятность ошибки в значительной степени зависит от точности используемой системы (суммарный коэффициент вариации при дозировании образцов и реагентов и регистрации ОП, превышающий 10 % существенно понижает качество верификации).

#### 15. ЛИТЕРАТУРА

См. французскую версию.

## **МОНОЛИЗА® анти-HBc ПЛЮС** **MONOLISA® anti-HBc PLUS**

1 планшет – 96 тестов 72315

5 планшетов – 480 тестов 72316

---

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ  
АНТИТЕЛ К НУКЛЕОКАПСИДНОМУ (ЯДЕРНОМУ) HBc  
АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ  
ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА.**

---



Для использования в диагностике In Vitro

### **Контроль качества производителя**

*Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья, и до продажи продукта пользователю.*

*Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям.*

*Сведения о продукции и контроле каждой серии хранятся в компании БИО-РАД (BIO-RAD).*

**ООО «Био-Рад Лаборатории»**  
125167 Москва, Ленинградский пр-т., 37А, корп. 14  
Бизнес-центр «Западный мост»  
Тел.: (495) 7211404, Факс: (495) 7211412, [post@bio-rad.ru](mailto:post@bio-rad.ru)

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 - КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.....                                                 | 3  |
| 2 - ПРИНЦИП ТЕСТА МОНОЛИЗА® анти-НВс ПЛЮС. ....                               | 3  |
| 3 - СОСТАВ НАБОРА .....                                                       | 3  |
| 4 - МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ.....             | 4  |
| 5 - ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.....                                                 | 4  |
| 6 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....                                               | 5  |
| 7 - ОБРАЗЦЫ .....                                                             | 6  |
| 8 - ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ.....                   | 6  |
| 9 - МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.....                                          | 7  |
| 10 - РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....                                 | 8  |
| 11 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ..... | 9  |
| 12 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ. ....                                        | 10 |
| 13 – ОГРАНИЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТА. ....                                       | 11 |
| 14 – ЛИТЕРАТУРА. ....                                                         | 11 |

## 1 - КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

При первичном инфицировании вирусом гепатита В, первыми антителами, появляющимися после определения в крови HBs и HBe антигенов, являются анти-HBc антитела. IgM антитела являются первичным ответом на инфекцию. Уровень IgM антител остается определяемым в течении нескольких недель и исчезает по мере выздоровления. IgG антитела вырабатываются позднее и остаются в крови в течении многих лет после выздоровления. Наличие антител к нуклеокапсиду вируса гепатита В (или ядерному антигену) является главным маркером недавней (антитела анти-HBc IgM) или прошедшей (общие анти-HBc антитела) инфекции. У пациентов с хронической инфекцией обычно наблюдается высокий титр анти-HBc антител.

Анти-HBc - представляет собой длительно присутствующий маркер, который указывает на HBV инфекцию. Он может наблюдаться в по крайней мере трех ситуациях:

ассоциировано с HBs антигеном, ассоциировано с анти-HBs антителами, и, в некоторых редких случаях, изолированно. Тестирование донорской крови и продуктов крови на присутствие анти HBc-антител является полезным инструментом для профилактики распространения вируса гепатита В.

## 2 - ПРИНЦИП ТЕСТА МОНОЛИЗА® анти-HBc ПЛЮС.

МОНОЛИЗА® анти-HBc ПЛЮС - это иммуноферментный тест (непрямой ИФА) для одновременного выявления общих антител к HBc-антигену в сыворотке или плазме. В МОНОЛИЗА® анти-HBc ПЛЮС в качестве твердой фазы используются рекомбинантный HBc антиген. Проведение теста состоит из следующих этапов:

1. Исследуемая и контрольная сыворотки вносятся в лунки. При наличии антител к HBc антигену они связываются с антигеном, фиксированным на твердой фазе.
2. Антитела против IgG и IgM человека, меченые пероксидазой, добавляются после стадии промывки и связываются со специфическими антителами, связавшимися с твердой фазой.
3. После удаления несвязавшегося конъюгата комплекс антиген-антитело выявляется добавлением раствора субстрата.
4. После остановки реакции измеряют оптическую плотность с помощью спектрофотометра при 450/620-700 нм. По величине поглощения судят о наличии или отсутствии антител к HBc антигену. Интенсивность цветной реакции пропорциональна количеству антител к HBc антигену, связанных на твердой фазе.

## 3 - СОСТАВ НАБОРА

| Метка | Наименование реагента                                                                                                                                 | Количество         |                    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|       |                                                                                                                                                       | 1 планшет          | 5 планшетов        |
| R1    | Микропланшет: 12стрипов по 8 лунок, покрытых очищенным рекомбинантным антигеном                                                                       | 1                  | 5                  |
| R2    | Промывочный раствор: 20х концентрат Трис NaCl буфера, pH 7.4<br>Консервант: ProClean™ (0.04 %)                                                        | 1 флакон<br>70мл   | 1 флакон<br>235 мл |
| R3    | Отрицательная контрольная сыворотка: Сыворотка человека, отрицательная по анти-HBc.<br>Консервант: азид натрия (0,1%)                                 | 1 флакон<br>1,5 мл | 1 флакон 3 мл      |
| R4    | Положительная контрольная сыворотка: Сыворотка человека, содержащая анти-HBc антитела. Фотохимически инактивированная. Консервант: азид натрия (0,1%) | 1 флакон<br>1,5 мл | 1 флакон 3 мл      |
| R6    | Раствор для разведения образцов: PBS буфер, с окрашенным контролем внесения образца. Консервант: ProCln™ (0,1%) и Ципрофлоксацин 10 мг/мл             | 1 флакон<br>30мл   | 2флакона<br>2х60мл |
| R7    | Конъюгат: козы антитела против IgG и IgM человека (зеленый раствор), меченые пероксидазой. Консервант: ProCln™ (0,1%) и Ципрофлоксацин 10 мг/мл       | 1 флакон<br>30мл   | 2флакона<br>2х60мл |
| R8    | Субстратный раствор: цитрат и ацетат натрия, pH 4,0, содержащий 0,015% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 4% ДМСО.                                       | 1 флакон<br>80мл   | 2флакона<br>2х60мл |

|     |                                                         |                  |                       |
|-----|---------------------------------------------------------|------------------|-----------------------|
| R9  | Хромоген: раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ). | 1 флакон<br>5 мл | 2 флакона<br>2х5 мл   |
| R10 | СТОП-раствор: 1 N серная кислота                        | 1 флакон<br>28мл | 3 флакона<br>3 x 28мл |
|     | Самоклеющаяся пленка для микропланшетов                 | 4                | 12                    |

#### 4 - МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Дистиллированная или деионизованная вода.  
 Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия.  
 Фильтровальная бумага.  
 Защитные очки.  
 Одноразовые перчатки.  
 Одноразовые пробирки.  
 Автоматические или полуавтоматические пипетки с постоянным и переменным объемом на 20, 100, 200 и 1000 мкл.  
 Мерные цилиндры на 10, 200 и 1000 мл.  
 Встряхиватель типа VORTEX.  
 Контейнер для контаминированных остатков.  
 Водяная баня на  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  или  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  или эквивалентный сузовоздушный инкубатор (\*).  
 Вошер для промывки микропланшет (автоматический, полуавтоматический, ручной).(\*)  
 Фотометр для микропланшетов (фильтры с длиной волны - 450/620 - 700 нм).(\*)

(\*) Обращайтесь в местное представительство компании за информацией о рекомендуемом оборудовании.

#### 5 - ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты, входящие в набор предназначены для диагностики *in vitro*.

Наименование теста, а также его идентификационный номер находятся на рамке каждого микропланшета. Идентификационный номер также нанесен на каждый стрип.

**MONOLISA® anti-HBc PLUS: Specific ID Number = 14.**

Проверьте идентификационный номер перед использованием теста. При отсутствии идентификационного номера, или его несоответствии номеру, указанному выше, стрип не использовать.

Используйте одноразовые перчатки при работе с реагентами и образцами и тщательно мойте руки после работы.

Не пипетируйте образцы и реагенты ртом.

Все сыворотки человеческой природы, использованные для приготовления отрицательного контроля (R3), были протестированы на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag), анти-HBc антител а также анти-ВИЧ-I, ВИЧ-2 и анти-ВГС антител и определены как отрицательные по этим маркерам.

Все сыворотки человека, использованные для приготовления положительного контроля (R4), были протестированы и определены как положительные по наличию HBs Ag и анти-HBc антител, и отрицательные по анти-ВИЧ-I и ВИЧ-2 антителам, а также по анти-ВГС антителам. Эти сыворотки были фотохимически инактивированы.

Ни один метод детекции не может гарантировать отсутствие патогенных агентов (ВИЧ, ВГС, ВГВ и других патогенов) в исследуемых образцах и реагентах человеческого происхождения. Следует рассматривать их как потенциально инфекционный материал и работать с соответствующими мерами предосторожности. Считайте любой материал, контактирующий с образцами, реагенты человеческого происхождения и промывающий раствор инфекционным материалом.

Избегайте контакта субстратного буфера, хромогена и стоп-раствора с поверхностью кожи и слизистыми (возможное отравление, воспаление, ожоги);

Избегайте разливания образцов или растворов, содержащих образцы.

В случае разлития растворов, не содержащих кислоты, обработайте поверхности 10% раствором гипохлорида натрия. В случае разлития кислотосодержащих растворов нейтрализуйте их бикарбонатом натрия и обработайте гипохлоридом натрия. Затем протрите фильтровальной бумагой, которую необходимо выбросить в контейнер для загрязненных отходов.

Образцы и реагенты человеческого происхождения, как и загрязненные материалы следует выбрасывать только после дезактивации, произведенной:

- замачиванием в растворе гипохлорида натрия в конечной концентрации не менее 5% в течение 30 минут.
- или автоклавированием при 121°C в течение 2 часов.

## **ВНИМАНИЕ! НЕ АВТОКЛАВИРУЙТЕ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ.**

Избегайте любого контакта субстратного раствора, хромогена и стоп-раствора с кожей и слизистыми оболочками (возможно отравление, воспаление и ожоги).

Не забывайте нейтрализовать и/или автоклавировать промывные остатки или любые жидкости, содержащие биологические образцы, до слива их в раковину.

Некоторые реагенты содержат азид натрия. Этот компонент может реагировать со свинцом и медью, образуя взрывоопасные соединения. Сливая в раковину, разводите остатки большим количеством воды во избежание их накопления в трубах.

Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество ProCiln™ 300 (0,04; 0,1 %), который может вызывать раздражение кожи и слизистых

R43: может вызывать раздражение кожи при контакте.



S28-37: после контакта с кожей промойте участок контакта большим количеством воды с мылом. При работе используйте защитные перчатки.

Таблица данных по безопасности реагентов можно получить по дополнительному запросу

## **6 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Качество результатов зависит от выполнения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices):

Не используйте реагенты по истечении срока их годности.

Не смешивайте и не используйте в одном и том же тесте реагенты из разных серий.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11x, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 x голубого цвета или маркировка 10 x оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

Перед началом использования выдержите реагенты при комнатной температуре (в течение 30 минут).

При приготовлении реагентов избегайте возможности контаминации.

Не проводите исследования в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или при сильном запылении воздуха в лаборатории так, как это может повлиять на ферментативную активность конъюгата.

Перед использованием стеклянной посуды тщательно промойте ее и ополосните деионизованной водой, предпочтительнее использовать одноразовую посуду.

После окончания процедуры промывки перед внесением реагентов не позволяйте пересыхать содержимому лунок.

Раствор для ферментативной реакции (субстратный раствор + хромоген) должен быть розового цвета. Изменение розового цвета в течение нескольких минут после приготовления раствора указывает на то, что его нельзя использовать и следует заменить. Приготовление раствора для ферментативной реакции должно производиться в пластиковых одноразовых лотках или в стеклянных контейнерах, которые следует предварительно промыть 1N раствором HCl, тщательно прополоскать дистиллированной водой и высушить. Данный реагент следует хранить в темноте.

Для раскапывания каждой сыворотки используйте новый наконечник для микропипеток.

Промывка лунок микропланшета является критической процедурой: рекомендуется тщательно соблюдать количество циклов промывки, внимательно следить за тем, чтобы заполнение лунок промывочным раствором и его удаление из них было полным. Несоблюдение требований к процедуре промывки микропланшета может привести к ошибочным результатам анализа.

Не используйте одну и ту же емкость для работы с конъюгатом и раствором для ферментативной реакции.

Проверьте точность и правильность работы микропипеток, а также другого оборудования.

Не меняйте протокол проведения исследования, утвержденный фирмой-производителем набора.

## 7 - ОБРАЗЦЫ

Образцы крови собираются согласно существующим инструкциям. Исследование должно быть выполнено на сыворотке или плазме (сборной с ЭДТА, гепарином, цитратом, антикоагулянтами на основе ACD, CPD, CPDA). Во избежании гемолиза эритроциты следует отделять как можно быстрее. Гемолиз может повлиять на результаты анализа.

Образцы, содержащие агрегаты следует отцентрифугировать до тестирования. Взвешенные фибриновые агрегаты или частицы могут быть причиной ложноположительных результатов.

Если тестирование проводится в течение 7 дней после взятия материала, образцы следует хранить при +2-8°C или их можно заморозить при -20° C для длительного хранения. Избегайте повторного замораживания/оттаивания. Если образцы необходимо транспортировать, их следует упаковать в соответствии с правилами транспортировки этиологических агентов.

**НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННЫЕ, ГИПЕРЛИПИМИЧЕСКИЕ И ГЕМОЛИЗИРОВАННЫЕ СЫВОРОТКИ.**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Образцы, содержащие альбумин до 30 г/л, билирубин 200 мг/л, липемические образцы, содержащие до 36 г/л эквивалента триглицеридов, и гемолизированные пробы, содержащие гемоглобин до 5 г/л могут быть исследованы с достоверным результатом.

## 8 - ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Перед использованием реагентов набора доведите их до комнатной температуры (в течение 30 минут).

### 1) Реагенты, готовые к использованию

**HBc Ag микропланшет (R1)**

Каждый микропланшет состоит из 12 стрипов, установленных в рамке. Он упакован герметично в пакет, который снабжен замком-клипсой. Перед вскрытием упаковки выдержите планшет в пакете при комнатной температуре, во избежании появления конденсата в лунках планшета. Раскройте пакет ножницами или скальпелем на 0,5-1 см выше линии клипсы. Откройте его и достаньте планшет. Не используйте

стрипы положите в пакет, запечатайте и храните при  $+2 - 8^{\circ}\text{C}$ .

Отрицательная контрольная сыворотка (R3)

Положительная контрольная сыворотка (R4)

Раствор для разведения образцов (R6)

Перед использованием перемешайте содержимое флакона мягкими движениями - переворачиванием флакона вверх дном.

Конъюгат (K7)

Перед использованием перемешайте содержимое флакона мягкими движениями - переворачиванием флакона вверх дном.

## 2) Реагенты, требующие приготовления

Промывающий раствор (R2)

Для получения рабочей концентрации промывочного раствора развести концентрат

R2 1:20 дистиллированной водой. 800 мл промывочного раствора в рабочей концентрации достаточно для промывки одного микропланшета (12 стрипов).

Раствор для ферментативной реакции (R8+R9)

Разведите раствор R9 1:11 в реагенте R8 (пример: 1 мл реагента R9 + 10 мл реагента R8). 10

мл необходимо и достаточно для 1-12 стрипов. Тщательно перемешайте.

## 3) Срок годности и стабильность

Набор хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$ . При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе может быть использован до даты, указанной на упаковке.

R1 : После вскрытия вакуумной упаковки стрипы можно использовать в течение 1-го месяца, сохраняя их в аккуратно запечатанном пакете при  $+2 - 8^{\circ}\text{C}$ .

R2: Разведенный промывочный раствор можно использовать в течение 2-х недель при хранении  $+2 - 30^{\circ}\text{C}$ . Концентрат промывочного раствора (R2) может храниться при  $+2 - 30^{\circ}\text{C}$ .

R8 + R9: После приготовления реагент может использоваться в течение 6 часов при комнатной температуре ( $18 - 30^{\circ}\text{C}$ ) в темном месте.

## 9 - МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Строго соблюдайте инструкцию к набору.

В каждом исследовании необходимо использовать положительные и отрицательные контрольные образцы для подтверждения выполнения требований по контролю качества анализа.

Следуйте правилам GLP "хорошей лабораторной практики"

Для выполнения теста МОНОЛИЗА® анти-НВс ПЛЮС можно использовать одну из двух процедур:

|                        | Процедура 1                                                   | Процедура 2                |
|------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Инкубация образца      | $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$                                    | $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ |
|                        | 30±5 минут<br>водяная баня/суховоздушный инкубатор            |                            |
| Инкубация с конъюгатом | $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$                                    | $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ |
|                        | 60 ± 5 минут<br>водяная баня/суховоздушный инкубатор          |                            |
| Ферментативная реакция | 30 ± 5 минут<br>при комнатной температуре 18-30°C (в темноте) |                            |

1. Тщательно подготовьте таблицу распределения образцов, реагентов и их идентификации.
2. Приготовьте раствор для промывания.
3. Извлеките рамку микропланшета (R1) и необходимое количество стрипов из пакета.
4. Внесите реагенты в следующей последовательности:
  - 4.1 200 мкл раствора для разведения (R6) в каждую лунку.
  - 20мкл отрицательного контроля (R3) в A1, B1.
  - 20мкл положительного контроля (R4) в C1, D1, E1.

20мкл первого исследуемого образца в F1 если эта лунка не используется как контрольная для мониторинга правильности и точности разнесения образцов.

20мкл второго исследуемого образца в G1 и т.д.

В зависимости от используемой автоматизированной системы возможно изменять порядок внесения и расположение контрольных образцов на планшете.

Тщательно перемешайте реакционную смесь с помощью 20 мкл пипетки (минимум 3 раза) либо путем встряхивания микропланшета после разнесения образцов.

Возможно внесение 220мкл предварительно разведенного (1:11) образца.

Если внесение образцов на планшет занимает более 10 минут, то рекомендуется вносить отрицательные и положительные контроли после тестируемых образцов.

Примечание: После внесения образцов, пурпурный раствор превратится в синий.

Правильность и точность разнесения образцов можно оценить

спектрофотометрически, считав оптическую плотность при 620 нм (см. Часть 11 настоящего руководства: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ

РАЗНЕСЕНИЯ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ).

5. Герметизируйте лунки планшета клейкой пленкой.

6. Инкубируйте микропланшет в водяном термостате или инкубаторе в течение  $30 \pm 5$  минут:

процедура 1:  $30 \pm 5$  минут при  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,

процедура 2:  $30 \pm 5$  минут при  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

7. Снимите самоклеющуюся пленку и удалите содержимое лунок в контейнер для контаминированных отходов, содержащий гипохлорид натрия, и добавьте в каждую лунку не менее 0.370 мл промывающего раствора. Снова удалите жидкость. Третьи повторите процедуру промывания (всего 4 промывки). Остаточный объем должен быть меньше 10 мкл. При необходимости переверните планшет вверх дном и выбейте остатки жидкости о фильтровальную бумагу. При использовании автоматического промывателя осуществите промывание в таком же режиме.

8. Внесите по 200 мкл конъюгата во все лунки. Перед использованием конъюгат необходимо тщательно, но осторожно перемешать.

Примечание: Конъюгат окрашен в зеленый цвет. Правильность и точность разнесения конъюгата можно оценить спектрофотометрически, считав оптическую плотность при 450 нм (см. Часть 11 настоящего руководства:

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ РАЗНЕСЕНИЯ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ)

9. Герметизируйте лунки планшета новой самоклеющейся пленкой и инкубируйте:

процедура 1:  $30 \pm 5$  минут при  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,

процедура 2:  $30 \pm 5$  минут при  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

10. Удалите самоклеющуюся пленку, удалите содержимое всех лунок и отмойте 4 раза, как описано выше. Остаточный объем должен быть меньше 10 мкл. При необходимости переверните планшет вверх дном и выбейте остатки жидкости о фильтровальную бумагу.

11. Приготовьте раствор для ферментативной реакции (см. гл.8, реагенты R8+R9).

12. Быстро внесите во все лунки по 100 мкл свежеприготовленного раствора для ферментативной реакции (R8+R9), поместите планшет в темное место. Реакция должна протекать в темноте  $30 \pm 5$  минут при комнатной температуре ( $18-30^\circ\text{C}$ ). Не используйте самоклеющуюся пленку во время этой инкубации.

Примечание: Правильность и точность разнесения раствора для ферментативной реакции, окрашенного в розовый цвет можно оценить визуально. Существует четкая разница между пустой лункой и лункой, содержащей раствор для ферментативной реакции, считав оптическую плотность при 450 нм (При автоматической оценке см. Часть 11 настоящего руководства: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ РАЗНЕСЕНИЯ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ)

13. Добавьте 100 мкл стоп-раствора (R10), используя ту же последовательность внесения реагента, как и для субстратного раствора. Перемешайте содержимое лунок.

14. Тщательно протрите дно планшета. Подождите минимум 4 минуты после добавления стоп-реагента и только после этого проводите измерение оптической плотности при 450/620-700 нм, используя фотометр для планшетов. Измерение можно проводить в период до 30 минут после остановки реакции.

15. Проверьте соответствие вашего плана внесения реагентов и образцов с результатами.

## 10 - РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие или отсутствие анти-НВс антител определяется путем сравнения оптической плотности в исследуемых образцах с величиной критического значения оптической плотности (ОП крит./cut-off).

1) Вычислите среднее значение оптической плотности положительного контроля:

(ОП R4) Пример: Положительный контроль R4

Лунки                      Оптическая плотность

C1                          1.796

D1                          1.802

E1                          1.852

Суммарное                5.450

Среднее ОП R4=Суммарное ОП/3=5.450/3=1.817

2) Расчет контрольного уровня (ОП крит./cut-off)

ОП крит. = ОП R4 /5

Пример: ОП R4 =1.817

ОП крит. =1.817/5=0.363

**Достоверность анализа:**

а) Для отрицательного контрольного образца:

все отдельные величины оптической плотности отрицательных контрольных образцов должны быть ниже 0.100.

б) Для положительного контрольного образца:

- Величина оптической плотности каждого положительного контрольного образца должна быть больше или равна 1.000 и меньше или равна 2.900.

- Если одно из значений оптической плотности положительного контрольного образца выходит за эти пределы или отличается от среднего значения больше, чем на 30%, исключите это значение из расчетов и вновь рассчитайте среднее по двум оставшимся значениям.

Анализ должен быть выполнен повторно, если больше одного значения ОП положительного контрольного образца не укладываются в указанные границы.

**Интерпретация результатов:**

Образцы со значением оптической плотности меньше, чем величина критического значения оптической плотности (ОП крит./cut-off), рассматриваются в тесте МОНОЛИЗА® анти-НВс ПЛЮС как отрицательные.

Однако, результаты ниже критического значения оптической плотности менее, чем на 10%

ОП крит. -- 10 % < ОП обр. должны быть интерпретированы с особым вниманием (рекомендуется повторить исследования дублирующих проб соответствующих образцов).

образцы с оптической плотностью равной или больше контрольного уровня рассматриваются как первично положительные и должны быть тестированы повторно в дубли для окончательной интерпретации.

Первично реактивный образец или образец с сомнительным результатом ( $0,9 < \text{коэффициент реактивности} < 1$ , где коэффициент реактивности = ОП обр./ ОП крит.) после повторного тестирования рассматривается как положительный в том случае, если хотя бы один из результатов дублирующих проб соответствующего образца имеет оптическую плотность равную или выше критического значения (ОП крит.).

Если после повторного тестирования оба результата имеют оптическую плотность ниже критического значения, образец в тест-системе МОНОЛИЗА® анти-НВс ПЛЮС рассматривается как отрицательный.

## 11 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ.

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ.**

После внесения образцов цвет раствора для разведения образцов меняется с фиолетового на синий.

**Метод 1: без использования контрольной лунки.**

Присутствие образца в лунке выявляется автоматически при измерении оптической

плотности ее содержимого на длине волны 620 нм: сопоставляются оптические плотности в каждой лунке после внесения раствора для разведения образцов (R6) и после добавления образцов.

Оптическая плотность лунок содержащих раствор для разведения образцов (R6) должна быть выше 0.500.

При внесении образца, изменение ОП должно быть больше чем на 0.200. (изменение оптической плотности при внесении образца меньше, чем на 0.200 указывает на ошибку при внесении образца).

**Метод 2: использование контрольной лунки.**

Присутствие образца в лунке выявляется автоматически при измерении оптической плотности ее содержимого на длине волны 620 нм с использованием контрольной лунки, содержащей только раствор для разведения образцов (R6): сопоставляются оптические плотности в каждой лунке после добавления образцов с оптической плотностью содержимого контрольной лунки.

Оптическая плотность контрольной лунки содержащей R6 должна быть выше 0.500.

Разница оптической плотности лунок, содержащих R6 и образцы, по сравнению с контрольной лункой, должно быть больше чем 0.200 (изменение оптической плотности меньше чем на 0.2 указывает на плохое разнесение образца).

#### **СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ПРИСУТСТВИЯ КОНЬЮГАТА.**

Конъюгат (R7) должен быть окрашен в зеленый цвет.

Присутствие конъюгата (R7) в лунке может быть проконтролировано автоматически при измерении оптической плотности содержимого на длине волны 450 нм:

Величина ОП каждой лунки должна быть выше, чем 0.300 (оптическая плотность меньше чем 0.300 указывает на ошибку при внесении конъюгата).

#### **ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ.**

Присутствие раствора для ферментативной реакции, окрашенного в розовый цвет в лунке может быть проконтролировано автоматически при измерении оптической плотности содержимого на длине волны 490 нм: величина ОП каждой лунки должна быть выше, чем 0.100 (меньшая оптическая плотность указывает на ошибку при внесении раствора для ферментативной реакции).

## **12 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ.**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** учитывая отсутствие подтверждающего теста для анти-НВс антител, крайне затруднительно определить истинность результатов скринингового теста. Поэтому при определении представленных ниже характеристик в качестве референсных использовались другие тест-системы для выявления анти-НВс.

Исследования чувствительности тест-системы **МОНОЛИЗА® анти-НВс ПЛЮС** проводили на 430 положительных образцах, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом гепатит В и отслеживаемой клинической картиной, а также на двух панелях для исследования чувствительности из документированных образцов, полученных от пациентов, инфицированных вирусом гепатита В. Клиническая чувствительность, полученная при исследовании 430 положительных образцов, результаты которых сопоставлялись с результатами референсного теста, составила 99,53 % (428/430). Три образца были определены как отрицательные, но один из них при исследовании во втором референсном тесте также дал отрицательный результат. Из двух других образцов оптическая плотность во втором референсном тесте для одного пациента определялась как близкая к критическому значению (коэффициенты реактивности 1,08 и 1,09). Аналитическая чувствительность определялась с использованием IgG и IgM стандартов Института Пауля Эрлиха, полученная минимальная определяемая концентрация составила 0,5 Ед РЕ/мл и 8 Ед РЕ/мл для IgG и IgM соответственно.

Специфичность тест-системы, исследованная на 5071 образце, полученных от случайной выборки доноров, составила 99,9 %. Специфичность тест-системы, полученная при исследовании 439 клинических образцов, составила 99,5 %.

Среди образцов от 220 пациентов с физиологическим статусом или патологией, не связанными с ВГВ инфекцией (беременные женщины, пациенты с ревматоидным фактором, с анти-нуклеарными антителами или маркерами другой вирусной инфекции) 16 образцов определялись как положительные в тесте **МОНОЛИЗА® анти-НВс ПЛЮС**. Среди этих 16 образцов, 15 определялись как положительные в одном из двух других тестов и один образец (ВГА IgM положительный) был определен как отрицательный, но его объема не хватило для тестирования во второй тест-системе.

Для исследования воспроизводимости тест-системы Монолиза® анти-НВс ПЛЮС были использованы 4 образца: 1 отрицательный образец, 2 положительных образца (образец 2 и 3) и 1 образец с высоким содержанием анти-НВс антител.

Воспроизводимость результатов в одном исследовании оценивалась с использованием указанных 4 образцов, каждый из которых был повторен в 30 пробах. Воспроизводимость результатов между сериями исследований определяли с использованием указанных 4 образцов, которые исследовали 3 раза на 2 планшетах в течение 5 дней в двух независимых сериях исследований ежедневно. Результаты представлены в следующих таблицах:

Табл. 1: Воспроизводимость результатов в одном исследовании

| N = 30                                     | Образец<br>№1 | Образец<br>№2 | Образец<br>№3 | Образец<br>№4 |
|--------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Среднее значение коэффициента реактивности | 0,20          | 2,09          | 2,71          | 6,44          |
| Стандартное отклонение (SD)                | 0,02          | 0,08          | 0,18          | 0,27          |
| Среднее квадратичное отклонение CV (%)     | 7,77          | 3,72          | 6,82          | 4,15          |

Табл. 2: Воспроизводимость результатов в 40 сериях исследований

| N = 30                                     | Образец<br>№1 | Образец<br>№2 | Образец<br>№3 | Образец<br>№4 |
|--------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Среднее значение коэффициента реактивности | 0,22          | 2,18          | 2,69          | 6,41          |
| Стандартное отклонение (SD)                | 0,05          | 0,28          | 0,10          | 0,20          |
| Среднее квадратичное отклонение CV (%)     | 23,42         | 12,78         | 3,53          | 3,17          |

### 13 – ОГРАНИЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТА.

Отрицательный результат свидетельствует, что образец не содержит анти-НВс антитела в количестве, определяемом тест-системой Монолиза® анти-НВс ПЛЮС. Однако, такой результат не устраняет возможности наличия ВГВ инфекции.

Колориметрический метод контроля раскалывания образцов, конъюгата и ферментативных растворов не позволяет подтверждать точность дозирования. Данный метод показывает только присутствие образца, конъюгата и раствора для ферментативной реакции в лунке планшета. Процент ошибочных ответов при использовании данного метода сильно зависит от правильности использования набора (совокупный коэффициент вариации при внесении образцов и реагентов и при регистрации результатов, составляющий более 10 %, значительно снижает качество полученных результатов).

В случае очень плохой эффективности промывки лунок планшета после инкубации с конъюгатом, автоматический контроль внесения раствора для ферментативной реакции (проверка ОП содержимого лунок планшета при 490 нм) может дать неправильный результат ОП более 0,100 в тех лунках, в которые раствор для ферментативной реакции не вносился. Однако, в течение испытаний тест-системы ни в одном из 939 исследованных образцов такой эффект не наблюдался.

**14 – ЛИТЕРАТУРА.**

См. французскую версию инструкции.

# **МОНОЛИЗА HBc IgM ПЛЮС** **MONOLISA HBc IgM PLUS**

**96 тестов**

**72382**

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ IgM К  
 НУКЛЕОКАПСИДНОМУ (ЯДЕРНОМУ) HBc АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В.**



Для использования в диагностике In Vitro

*Контроль качества производителя*

*Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья, и до продажи продукта пользователю.*

*Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям.*

*Сведения о продукции и контроле каждой серии хранятся в компании БИО-РАД (BIO-RAD).*

**ООО «Био-Рад Лаборатории»**

**125167 Москва, Ленинградский пр-т., 37А, корп. 14**

**Бизнес-центр «Западный мост»**

**Тел.: (495) 7211404, Факс:(495) 7211412, post @ bio-rad.ru**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 - НАЗНАЧЕНИЕ .....                                                              | 3  |
| 2 - КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ .....                                                    | 3  |
| 3 - ПРИНЦИП ТЕСТА МОНОЛИЗА НВс IgM ПЛЮС .....                                     | 3  |
| 4 - СОСТАВ НАБОРА .....                                                           | 4  |
| 5 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....                                                   | 5  |
| 6 - ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ .....                                                    | 7  |
| 7 - МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ .....                     | 5  |
| 8 - ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ .....                                                    | 8  |
| 9 - СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ .....                                            | 9  |
| 10- ОБРАЗЦЫ .....                                                                 | 9  |
| 11 - МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА .....                                            | 10 |
| 12 – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И<br>РЕАГЕНТОВ ..... | 11 |
| 13 - РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....                                     | 11 |
| 14 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ .....                                            | 13 |
| 14 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТА .....                                           | 14 |
| 15 – ЛИТЕРАТУРА .....                                                             | 14 |

## 1 – НАЗНАЧЕНИЕ

**МОНОЛИЗА HBc IgM ПЛЮС** – набор для иммуно-ферментного анализа, основанный на принципе «сэндвича» для качественного определения IgM антител к ядерному антигену вируса гепатита В.

## 2 – КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Анти HBc антитела - первые антитела, появляющиеся в ходе инфицирования вирусом гепатита В (HBV). Чаще всего они выявляются в начальной фазе инфекции в ассоциации с HBs антигеном. В начальной стадии инфекции синтезируются антитела класса IgM, затем IgG класса. IgM антитела чаще персистируют в течение периода от нескольких недель до нескольких месяцев, а затем их титр постепенно снижается при выздоровлении. IgG антитела могут обнаруживаться в течение нескольких лет после выздоровления.

Определение IgM антител к HBc антигену позволяет поставить диагноз недавно перенесенного гепатита В и этот маркер особенно полезен, когда прекратилась HBs антигенемия, а анти -HBs антитела еще не появились. В некоторых случаях возможно определение невысокого уровня HBc IgM при хроническом вирусном гепатите В.

## 3 – ПРИНЦИП ТЕСТА МОНОЛИЗА HBc IgM ПЛЮС

**MONOLISA HBcIgM PLUS** - это двухшаговый иммуноферментный тест «сэндвич» типа, основанный на связывании сывороточных IgM антител на твердой фазе, с последующим добавлением конъюгата (HBc антиген - рекомбинантный белок полученный из дрожжей и связанный с пероксидазой). В качестве твердой фазы используются полистироловые лунки (по 8 в 12 стрипах), покрытые козьими антителами против человеческих IgM.

HBc-антиген непосредственно связан с пероксидазой.

Методика выполнения теста состоит из следующих фаз:

1. Инкубация контрольных сывороток и образцов в присутствии козьих антител против человеческих IgM, фиксированных на твердой фазе.
2. Промывание и инкубация иммобилизованных комплексов с HBc-антигеном, связанным с пероксидазой.
3. Отмывка несвязавшегося конъюгата, выявление ферментативной активности твердой фазы при добавлении субстрата.
4. Остановка реакции, измерение оптической плотности при 450/620-700 нм и интерпретация результатов.

#### 4 – СОСТАВ НАБОРА

Все реагенты предназначены исключительно для in vitro диагностики.

Реагентов достаточно, чтобы провести 96 определений в 1 - 12 независимых постановках.

| Метка | Реагент                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Форма выпуска         |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| R1    | Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами против человеческих IgM.                                                                                                                                                                                                                                   | 1 микропланшет        |
| R2    | Промывочный раствор: 20х концентрат Трис NaCl буфера, pH 7.4<br>Консервант: ProClean™ (0.04 %)                                                                                                                                                                                                                      | 1 флакон<br>70 мл     |
| R3    | Отрицательная контрольная сыворотка (человеческая):<br>Поставляется в растворимой форме. Готовая для использования.<br>Человеческая сыворотка, отрицательная по HBs Ag, анти-HIV-1, HIV-2 и HCV антителам.<br>Консервант: азид натрия < 0.1%.                                                                       | 1 флакон<br>2.5 мл    |
| R4    | Положительная контрольная сыворотка (человеческая): Поставляется в растворимой форме. Готовая для использования.<br>Человеческая сыворотка положительная по HBs Ag, HBe Ag и анти - HBc IgM, отрицательная по анти-HIV-1, HIV-2 и HCV антителам. Фотохимически инактивированная.<br>Консервант: азид натрия < 0.1%. | 1 флакон<br>2.5 мл    |
| R5    | Разводящий раствор для образцов:<br>Трис NaCl буфер pH=7.4 с добавлением Твин 20 - 0.1%, и 1% бычьего сывороточного альбумина.<br>Консервант: азид натрия < 0.1%.<br>Краситель: фенол красный.                                                                                                                      | 1 флакон<br>100 мл    |
| R6    | Лиофилизированный Конъюгат:<br>рекомбинантный HBc-антиген, меченый пероксидазой.                                                                                                                                                                                                                                    | 2 флакона<br>2 x 6 мл |
| R7    | Раствор для разведения конъюгата<br>Трис NaCl буфер pH=7.4 с добавлением Твин 20 - 0.1%.<br>Консервант: 0.01% мертиолят натрия.<br>Краситель: фенол красный.                                                                                                                                                        | 1 флакон<br>12 мл     |

| Метка | Реагент                                                                                                           | Форма выпуска     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| R8    | Субстратный раствор<br>Цитратный буфер, содержащий ацетат натрия и перекись водорода.<br>Диметилсульфоксид (DMSO) | 1 флакон<br>60 мл |
| R9    | Хромоген<br>Раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ)                                                          | 1 флакон<br>5 мл  |
| R10   | СТОП-Раствор<br>Раствор 1N серной кислоты                                                                         | 1 флакон<br>28 мл |
|       | Самоклеющаяся пленка                                                                                              | 4 шт.             |

## 5 – МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

Дистиллированная или полностью деионизированная вода  
 Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия  
 Фильтровальная бумага  
 Одноразовые перчатки  
 Одноразовые полистироловые пробирки (12 x 75 мм)  
 Контейнер для контаминированных отходов  
 Автоматические или полуавтоматические пипетки с постоянным и переменным объемом на 10, 100 и 1000 мкл.  
 Мерные цилиндры на 10, 200 и 1000 мл  
 Вортекс  
 Вошер для промывки микропланшетов (автоматический, полуавтоматический, ручной).(\*)  
 Водяная баня на 37°C 10°C или эквивалентный суховоздушный инкубатор или Инкубатор/шейкер с контролируемым температурным режимом. (\*)  
 Фотометр для микропланшетов (фильтры с длиной волны - 450/620-700 нм) (\*)

(\*) Обращайтесь в местное представительство компании за информацией о рекомендуемом оборудовании.

## 6 – МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Надежность результатов зависит от правильного выполнения правил Хорошей Лабораторной практики (Good Laboratory Practice):

Наименование теста, а также его идентификационный номер находятся на рамке каждого микропланшета. Идентификационный номер также нанесен на каждый стрип.

**Monolisa® HBc IgM PLUS : Specific ID number = 57**

Проверьте идентификационный номер перед использованием теста. При отсутствии идентификационного номера, или его несоответствии номеру, указанному выше, стрип не использовать.

Не используйте реагенты по истечении срока их годности;

Не смешивайте и не используйте в одном и том же исследовании реагенты из разных серий;

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20x, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11x, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 x голубого цвета или маркировка 10 x оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

Все реагенты перед использованием должны быть выдержаны при комнатной температуре в течение 30 минут (18-30°C);

Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.

Не проводите исследования вблизи паров кислот, щелочей, альдегидов или моющих растворов так, как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата;

Используйте только чистую лабораторную посуду, стеклянную посуду следует тщательно мыть и ополаскивать дистиллированной водой;

Промывка: строго соблюдайте режим промывания, это необходимо для максимальной эффективности теста;

Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию каких-либо металлов или их ионов. Следовательно, необходимо исключить возможность контакта ферментативных растворов (субстратный буфер, хромоген, раствор для ферментативной реакции и стоп-раствор) с металлами;

Раствор для ферментативной реакции (субстратный буфер + хромоген) должен быть розового цвета. Изменение розового цвета в течение нескольких минут после приготовления раствора указывает на то, что его нельзя использовать и следует заменить. Приготовление раствора для ферментативной реакции должно производиться в пластиковых одноразовых лотках или в стеклянных контейнерах, которые следует предварительно промыть 1N раствором HCl, тщательно прополоскать дистиллированной водой и высушить. Данный реагент следует хранить в темноте.

Пользуйтесь одноразовыми наконечниками для внесения каждого реагента и образца;

Никогда не используйте одну и ту же посуду для конъюгата (R6 R7) и раствора для ферментативной реакции (R8+R9).

Используйте для работы только поверенные и точные микропипетки.  
Не делайте изменений в методике проведения анализа.  
В каждой серии исследований вместе с исследуемыми образцами обязательно используйте контрольные сыворотки.  
Не допускайте пересыхания лунок микропланшета между этапами промывки и перед добавлением рабочих реагентов.  
Если в ферментативных растворах содержится суспензия частиц, допускается дождаться их оседания на дно флакона и только после этого раскатывать раствор (эти частицы не влияют на результаты теста).

## 7 – ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.

При выполнении теста используйте одноразовые перчатки.

Никогда не пипетируйте ртом.

Положительный контроль (R4) фотохимически инактивирован.

Все донорские сыворотки, использованные для приготовления отрицательного контроля (R3), были протестированы, и в них не были обнаружены поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антитела к вирусу гепатита С (анти-ВГС антитела) и антитела к ВИЧ (анти-ВИЧ-1, ВИЧ-2 антитела).

Все донорские сыворотки, использованные для приготовления положительного контроля (R4), были протестированы, и в них не обнаружены антитела к вирусу гепатита С (HCV антитела) и антитела к ВИЧ (HIV-1, HIV-2 антитела).

Ни один метод детекции не может гарантировать отсутствие вирусов ВИЧ, гепатита В или С или других инфекционных агентов. Следует рассматривать их как потенциально загрязненные и работать с соответствующими мерами предосторожности.

Оборудование и буферные растворы находящиеся в прямом контакте с человеческим биологическим материалом считаются загрязненными, следовательно, их необходимо дезинфицировать.

Избегайте разбрызгивания образцов или растворов содержащих образцы.

Загрязненную поверхность необходимо промыть 10% хлорной известью. В случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоты, обработайте поверхности 5% раствором гипохлорида натрия, а затем фильтровальной бумагой, которую необходимо выбросить в контейнер для загрязненных остатков.

Биологический материал, загрязненные материалы и реагенты необходимо утилизировать после деcontаминации:

- деcontаминации 5% гипохлоридом натрия (1 объем гипохлорида натрия на 10 объемов загрязненной жидкости или воды) в течение 30 минут
- автоклавирование при 121°C в течение 2 часов

**ВНИМАНИЕ!** Никогда не помещайте раствор гипохлорида натрия в автоклав.

Не забывайте нейтрализовать и/или автоклавировать отходы после процедуры промывки или любые жидкости, содержащие биологические образцы, до слива их в раковину.

Международный сертификат безопасности предоставляется по запросу.

Избегайте контакта кожи или слизистых с субстратным буфером, хромогенным агентом и стоп-реагентом (возможно токсическое воздействие, раздражение или ожоги).

При работе с химическими веществами и при их утилизации пользуйтесь правилами Хорошей Лабораторной практики (GLP).

Некоторые реагенты содержат консервант азид натрия. Азид натрия может образовывать азиды меди и свинца, такие соединения взрывоопасны. В целях предупреждения попадания азида натрия в водопроводные трубы содержащие медь и свинец, необходимо перед сливом дезактивированных растворов в городскую канализацию развести их в большом количестве воды.

Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество ProClin™ 300 (0.04%, 0.1% и/или 0.5%): который может вызывать раздражение



R43: может вызывать раздражение кожи при контакте.

S28/37: после контакта с кожей промойте участок контакта большим количеством воды с мылом.

При работе используйте защитные перчатки.

## 8 – ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием реагентов выдержите их при комнатной температуре в течение 30 мин (18-30°C)

### 1) Реагенты, готовые к использованию:

#### Микропланшет (R1)

Каждый микропланшет содержит 12 стрипов упакованных в герметичный пакет из фольги, снабженный замком-клипсой. Вскройте упаковку по с помощью скальпеля, сделав разрез на 0,5 – 1 см выше замка-клипсы. Извлеките из упаковки штатив-рамку и стрипы. Сразу же упакуйте неиспользованные стрипы, предварительно удалив воздух из пакета. Храните при +2+8°C.

Реагент 3 (R3): отрицательный контрольный образец

Реагент 4 (R4): положительный контрольный образец

Реагент 5 (R5): раствор для разведения образцов

Реагент 7 (R7): раствор для разведения конъюгата

Реагент 10 (R10): стоп-раствор

### 2) Реагенты, требующие приготовления:

#### Промывающий раствор (R2)

Разведите промывающий раствор R2 дистиллированной водой в соотношении 1:20. Для одного микропланшета из 12 стрипов необходимо 800 мл моющего раствора.

**Раствор конъюгата в рабочей концентрации (R6+R7)**

Разведите содержимое флакона с лиофилизированным конъюгатом (R6) в 6 мл раствора для разведения конъюгата (R7). Подождите 2 мин. Перемешайте.

Когда используется 1-6 стрипов, разведите только 1 флакон конъюгата (R6), если больше - 2 флакона, перемешайте все содержимое в каждом флаконе.

**Раствор для ферментативной реакции (R8+R9)**

Растворите в соотношении 1:11 реагент R9 (хромоген) в реагенте R8 (субстратный буфер) (например: 1 мл R9 в 10 мл реагента R8). Рабочий раствор для ферментативных реакций после приготовления стабилен 6 часов, хранить в темноте.

## **9 – СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ**

Набор хранить при температуре +2-8°C. При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе может быть использован до даты, указанной на упаковке.

**R1 :** После вскрытия вакуумной упаковки стрипы можно использовать в течение 1-го месяца, сохраняя их в аккуратно запечатанном пакете при +2 - 8 °C.

**R2:** Разведенный промывочный раствор можно использовать в течение 2-х недель при хранении +2 - 30 °C. Концентрат промывочного раствора (R2) может храниться при +2 - 30 °C.

**R6 + R7:** После приготовления реагент может использоваться в течение 2-х недель при хранении +2 - 8 °C.

**R8 + R9:** После приготовления реагент может использоваться в течение 6 часов при комнатной температуре (18 – 30 °C) в темном месте.

## **10 – ОБРАЗЦЫ**

Возьмите пробу крови согласно общепринятым правилам.

Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранной с антикоагулянтами на основе ЭДТА, цитрата, или гепарина).

Во избежании гемолиза отделите сыворотку или плазму от сгустка эритроцитов как можно быстрее. Обширный гемолиз может повлиять на результаты теста. Если в образцах наблюдаются взвешенные частицы, то они должны быть удалены перед анализом путем центрифугирования. Агрегаты и частицы фибрина в образце могут также приводить к ложнопозитивным результатам.

Образцы следует хранить при +2-8°C, если тестирование выполняется в течение 7 дней после взятия материала, или хранить при -20°C в течение нескольких месяцев. Образцы плазмы необходимо немедленно прогреть несколько минут при 40°C (для ограничения образования сгустков фибрина). Избегайте повторного замораживания образцов. Образцы нельзя использовать для исследования при замораживании и оттаивании более 3 раз. Если необходима транспортировка образцов, их следует упаковать в соответствии с правилами транспортировки этиологических агентов.

**НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННЫЕ И ГЕМОЛИЗИРОВАННЫЕ СЫВОРОТКИ, А ТАКЖЕ СЫВОРОТКИ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ.**

**ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ:** Образцы, содержащие до 90 г/л альбумина и 100 мг/л билирубина, липемические образцы, содержащие до 36 г/л эквивалента триолеина, гемолизированные образцы с содержанием гемоглобина до 10 г/л могут быть использованы для исследования.

## **11 – МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

1. Приготовьте промывающий раствор R2.
2. Разведите тестируемые образцы 1/101, используя разводящий раствор для образцов (R5) (10 мкл сыворотки+ 1000мкл реагента R5). Отрицательный (R3) и положительный (R4) контроли поставляются в уже разведенном виде. В отличие от исследуемых образцов контрольные образцы разводить не нужно.
3. Из упаковки извлеките рамку-штатив и стрипы микропланшета(R1). Установите необходимое число стрипов, оставшиеся аккуратно упакуйте обратно в пакет и закройте его.
4. Промойте лунки, заполнив их 370 мкл промывающего раствора. Полностью удалите содержимое лунок. Выполните процедуру промывки еще один раз. После второго промывания просушите лунки, перевернув микропланшет, промокните его о фильтровальную бумагу. Если используется автоматический вошер следуйте той же процедуре.
5. Внесите неразведенные отрицательный и положительный контроли и исследуемые, разведенные до соотношения 1/101, образцы в лунки в следующем порядке:
  - Лунки A1,B1,C1 : 100 мкл отрицательного контроля (R3),
  - Лунки D1,E1 и F1 : 100 мкл положительного контроля (R4),
  - Лунки G1, H1 и т.д. : 100 мкл исследуемых образцов.Положительный и отрицательный контрольные образцы поставляются в разведенной форме. В отличие от исследуемых образцов контрольные образцы разводить не нужно.
- В зависимости от используемой автоматизированной системы возможно изменять порядок внесения и расположение контрольных образцов на планшете.
6. Накройте планшет самоклеющейся пленкой и инкубируйте при 37 °C в течение 30 - 5 минут.
7. Подготовьте раствор конъюгата (R6+R7).

8. Снимите самоклеющуюся пленку, тщательно удалите содержимое лунок и промойте 3 раза, как описано в пункте 4.

9. Внесите по 100 мкл приготовленного раствора конъюгата во все лунки. Накройте самоклеющейся пленкой и инкубируйте 37 °C в течение 60 минут.

*ПРИМЕЧАНИЕ: На этой стадии внесение конъюгата, который окрашен в красный цвет, может контролироваться визуально. Существует четкое различие между пустыми лунками и лунками, содержащими конъюгат.*

10. Удалите самоклеющуюся пленку, тщательно удалите содержимое лунок и промойте 6 раз, как описано в пункте 4.

11. Приготовьте раствор для ферментативной реакции (R8 + R9).

12. Внесите 80 мкл прготовленного раствора для ферментативной реакции (R8 + R9) в лунки и поместите планшет в темное место на 30 5 минут при комнатной температуре (18 - 30°C). Не используйте самоклеющуюся ленту на этом этапе.

*ПРИМЕЧАНИЕ: На этой стадии внесение раствора для ферментативной реакции, который имеет розовый цвет, может контролироваться визуально. Существует четкое различие между пустыми лунками и лунками, содержащими розовый раствор для ферментативной реакции (для автоматической процедуры верификации см. главу 12: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)*

13. Добавьте 100 мкл СТОП-раствора (R10) в каждую лунку, в той же последовательности в которой вносили субстратный раствор. Перемешайте смесь.

*ПРИМЕЧАНИЕ: Контроль распределения бесцветного стоп-раствора по лункам на этой стадии может проводиться визуально. После добавления стоп-раствора для негативных образцов розовый субстрат становится прозрачным или голубой цвет субстрата (для положительных образцов) меняется на желтый.*

14. Аккуратно протрите нижнюю поверхность планшета. Подождите минимум 4 минуты после добавления стоп-раствора и только после этого проводите измерение оптической плотности при 450/620-700 нм. Измерение можно проводить до 30 минут после остановки реакции.

15. Сравните результаты исследования с планом внесения образцов в лунки микропланшета, который был составлен до выполнения анализа.

## **12 – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ**

Присутствие раствора для ферментативной реакции (R8+R9) в лунке можно проконтролировать посредством спектрофотометрии при длине волны 490 нм: величина ОП для каждой лунки должна быть больше или равна 0,100 (ОП ниже этого значения указывает на неадекватное внесение раствора для проявки).

## 13 – РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1) Расчет среднего значения оптической плотности отрицательного контроля: (ОП R3)ср.

|         |                           |       |
|---------|---------------------------|-------|
| Пример: | Отрицательный контроль R3 | ОП    |
|         | 1                         | 0.020 |
|         | 2                         | 0.015 |
|         | 3                         | 0.045 |

Сумма ОП R3 / 3 =  $0.080/3 = 0.026$  = (ОП R3)ср.

2) Расчет среднего значения оптической плотности положительного контроля: (ОП R4)ср.

|         |                           |       |
|---------|---------------------------|-------|
| Пример: | Положительный контроль R4 | ОП    |
|         | 1                         | 0.950 |
|         | 2                         | 0.880 |
|         | 3                         | 0.897 |

Сумма ОП R4 / 3 =  $2.727/3 = 0.909$  = (ОП R4)ср.

В случае, если одно из значений ОП положительного контрольного образца R4 отклоняется от среднего значения (ОП R4)ср. более, чем на 25 %, оно может быть исключено из расчетов. В этом случае вычислите среднее значение из оставшихся двух.

3) Вычисление критического значения оптической плотности (ОП крит.):

Критическое значение оптической плотности равно:  
(ОП R3)ср. + ((ОП R4)ср. / 7)

Пример: (ОП R3)ср. = 0.026, (ОП R4)ср. = 0.909  
ОП крит. =  $0.026 + (0.909 / 7) = 0.156$

4) Критерии достоверности результатов

Среднее значение ОП положительного контроля (ОП R4)ср. должно быть больше или равно 0.4 ед. ОП.

(ОП R4)ср.  $\geq 0.400$

Среднее значение ОП отрицательного контроля (ОП R3)ср. должно быть меньше или равно 0,1 ед. ОП.

(ОП R3)ср.  $\leq 0.100$

5) Расчет отношений образцов

Для каждого образца рассчитывается коэффициент реактивности (КР):

$$КР = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП крит.}}$$

6) Интерпретация результатов

Образцы с коэффициентом реактивности меньше 1.0 считаются отрицательными.

Образцы с коэффициентом реактивности больше или равным 1.0 считаются положительными.

## 14 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Характеристики МОНОЛИЗА HBc IgM ПЛЮС были получены при рандомизированном исследовании образцов крови доноров, пациентов с острым и хроническим гепатитом В или с заболеваниями несвязанными с гепатитом «В», а так же коммерческих образцов и сероконверсионных панелей.

### Специфичность

Параметры специфичности определялись при исследовании 1312 рандомизированных образцов крови доноров. Установлена специфичность 99.99% (1311/1312).

Параметры специфичности определялись так же при исследовании 202 образцов от больных. Установлена специфичность 99.5% (201/202).

Обследование 99 больных с различными заболеваниями и функциональными состояниями не связанными с вирусным гепатитом В (беременные женщины, ревматоидный фактор, другие вирусные инфекции) установило специфичность 100% (99/99).

### Аналитическая чувствительность

Нижний предел чувствительности набора 50 Е/мл установлен при исследовании стандартной панели PEI (ref IgM HBc 84).

### Чувствительность

Определение чувствительности выполнено на 199 положительных образцах от больных с острым и хроническим вирусным гепатитом В. Чувствительность набора 98,5%.

Так же проведены исследования 129 образцов, большая часть которых получена при острой инфекции 27 случаев и трех коммерческих сероконверсионных панелей в сравнении с другими доступными коммерческими ИФА наборами.

### Воспроизводимость

Воспроизводимость тест-системы МОНОЛИЗА HBc IgM Плюс установлена при анализе 4 образцов: 1 отрицательный образец, 2 HBc IgM положительных образца (образец 2 и 3) и 1 образец с высоким содержанием HBc IgM.

Внутри серийная воспроизводимость оценивалась на указанных 4 образцах с использованием 30 повторных проб для каждого образца в одном исследовании. Воспроизводимость между сериями исследовалась на указанных 4 образцах в дублирующих пробах в течение 20 дней ежедневно на двух независимых сериях исследований. Полученные результаты представлены в таблицах:

Табл. 1: Внутри серийная воспроизводимость

| N = 30                          | Образец №1 | Образец №2 | Образец №3 | Образец №4 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Среднее значение отношения к КУ | 0,21       | 2,32       | 4,11       | 5,42       |
| Стандартное отклонение (SD)     | 0,01       | 0,07       | 0,14       | 0,34       |
| Среднее квадратичное            | 5,38       | 3,21       | 3,44       | 6,22       |

|                   |  |  |  |  |
|-------------------|--|--|--|--|
| отклонение CV (%) |  |  |  |  |
|-------------------|--|--|--|--|

**Табл. 2: Между серийная воспроизводимость**

| N = 40                                 | Образец №1 | Образец №2 | Образец №3 | Образец №4 |
|----------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Среднее значение отношения к КУ        | 0,22       | 2,28       | 3,89       | 5,37       |
| Стандартное отклонение (SD)            | 0,05       | 0,26       | 0,51       | 0,59       |
| Среднее квадратичное отклонение CV (%) | 22,13      | 11,27      | 13,13      | 11,02      |

## 15 – ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТА

Отрицательный результат указывает на то, что исследованный образец не содержит anti- HBc IgM выявляемые набором МОНОЛИЗА HBc IgM ПЛЮС. Однако такой результат не исключает возможности наличия ВГВ инфекции.

Спектрофотометрический метод верификации внесения образцов, конъюгата и субстратного раствора не позволяет проверять точность дозирования. Этот метод показывает только наличие образца, конъюгата и субстратного раствора в лунке. Процент неправильных результатов, полученных этим методом, зависит от точности работы используемых устройств (если суммарный коэффициент вариации при дозировании и регистрации оптической плотности превышает 10%, качество спектрофотометрической верификации значительно снижается).

В случае низкого качества промывки после инкубации с конъюгатом, автоматическая верификация правильности внесения субстратного раствора (считывание значений оптической плотности содержимого лунок при длине волны 490 нм) может привести к неправильному результату: оптическая плотность может быть выше 0.100 даже при отсутствии субстратного раствора. Однако, при исследовании 939 образцов такой феномен не наблюдался.

## 16 – ЛИТЕРАТУРА

См. французскую версию инструкции.

# Монолиза Анти-HBs ПЛЮС

## Monolisa Anti- HBs PLUS

192 теста

72566

---

**Тест-система иммуноферментная для определения наличия и концентрации антител к поверхностному антигену гепатита В (Анти-HBs) в сыворотке/плазме крови человека.**

---



Для диагностики in vitro

**Контроль качества производителем**

Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья и до продажи продукта пользователю. Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям. Документы о производстве и контроле каждой серии хранятся в компании БИО-РАД (BIO-RAD).

**Адрес представительства в России:**

125167, Москва, Ленинградский пр-т, 37А, стр. 14

Тел.: (495) 721 14 04, Факс: (495) 721 14 12, e-mail: [post@bio-rad.ru](mailto:post@bio-rad.ru)

## **СОДЕРЖАНИЕ:**

- 1. НАЗНАЧЕНИЕ**
- 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**
- 3. ПРИНЦИП ТЕСТА**
- 4. СОСТАВ КОМПЛЕКТА**
- 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
- 6. ИНСТРУКЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ**
- 7. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ  
В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ**
- 8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**
- 9. СРОК ГОДНОСТИ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ**
- 10. ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**
- 11. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**
- 12. КРИТЕРИИ ПРАВИЛЬНОСТИ ВЫПОЛНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО  
АНАЛИЗА**
- 13. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**
- 14. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ  
ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦА И КОНЬЮГАТА**
- 15. ОГРАНИЧЕНИЯ**
- 16. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**
- 17. ЛИТЕРАТУРА**

## 1 - НАЗНАЧЕНИЕ:

Монолиза Анти-HBs ПЛЮС – тест-система, предназначенная для качественного и количественного определения содержания антител против HBs Ag в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

## 2 - КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Наличие антител к HBs Ag является важным фактором для диагностики и прогноза развития вирусного гепатита В. У больных острым ВГВ антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (Анти-HBs), обнаруживаются приблизительно в 80% случаев через 1-3 месяца после появления в крови поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag). Определение Анти-HBs используется для эпидемиологического контроля и выявления возможного контакта с гепатитом В в прошлом у лиц, подлежащих прививке против гепатита В, мониторинга вакцинации, а также с целью отбора доноров с высокой концентрацией антител в плазме для получения специфических иммуноглобулинов.

Монолиза Анти-HBs ПЛЮС – прямой иммуноферментный анализ (ИФА) по типу "иммуносэндвич". В тесте используются полистироловые микропланшеты покрытые нативным поверхностным антигеном гепатита В (HBs Ag (подтипов ad и ay) в качестве твердой фазы и конъюгат, содержащий меченый пероксидазой хрена HBs Ag человека (субтипов ad, ay). Определение уровня Анти-HBs стандартизовано согласно рекомендациям ВОЗ и выражается в мЕ/мл (mIU/ml). Уровень анти- HBs антител, равный или превышающий 10 мМЕ/мл, указывает на наличие поствакцинальной иммунной защиты по отношению к гепатиту В у привитых лиц. Концентрация анти- HBs антител 10 мМЕ/мл соответствует минимальному пороговому уровню иммунитета к вирусному гепатиту. Наличие пограничного иммунитета (минимальный титр 10 мМЕ/мл) является решающим фактором для дальнейших мероприятий в отношении привитых против вирусного гепатита лиц, для которых не исключен контакт с биологическими жидкостями и материалами, содержащими HBs Ag.

## 3 – ПРИНЦИП ТЕСТА:

При выполнении анализа исследуемые и контрольные образцы помещаются в лунки микропланшетов, покрытых иммобилизованным антигеном и инкубируются. Если антитела против HBs присутствуют в образце или в контроле, то они будут связываться с антигеном. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Затем в лунки добавляется конъюгат, который связывается с комплексами антиген-антитело в лунках планшета. Излишек конъюгата удаляется промывкой. На следующем этапе в лунки вносится раствор хромогена/субстрата и вновь проводится инкубация.

Если исследуемый образец содержит антитела к HBs Ag, то конъюгированный фермент (пероксидаза хрена) изменяет цвет хромогена тетраметилбензидина (ТМБ) в растворе на голубой. После добавления блокирующего раствора голубой цвет содержимого лунки меняется на желтый.

Если исследуемый образец не содержит антитела против HBs Ag, то содержимое лунок остается бесцветным в процессе инкубации субстрата и после добавления блокирующего реактива.

Интенсивность окраски раствора оценивается при помощи спектрофотометра и прямо пропорциональна количеству антител против HBs Ag в образце.

Оптическая плотность исследуемого образца сравнивается с пороговым значением (cutoff) оптической плотности, измеренной посредством калибратора, содержащего 10 мМЕ/мл.

## 4 - СОСТАВ КОМПЛЕКТА

Вложенные реагенты использовать только для диагностики in vivo.

| Название на этикетке | Состав и описание реактива                                                                                                                                                      | Количество     |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| R1                   | Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок, содержащих смесь поверхностного антигена гепатита В человека (субтипы ad и ay)                                                             | 2 планшета     |
| R2                   | Концентрат промывающего раствора (20х)<br>Трис-NaCl раствор pH = 7,4<br>Консервант: ProCin 300 (0.04%)                                                                          | 1 фл<br>235 мл |
| C0                   | Отрицательный контроль образец<br>Буферный раствор содержащий фетальную бычью сыворотку и стабилизаторы протеинов<br>Консервант: ProCin 300 (0.5%)                              | 1 фл<br>2,2 мл |
| C1                   | 10 мМЕ/мл раствор калибратора*<br>Буферный раствор, содержащий человеческие антитела против HBs Ag, фетальную бычью сыворотку, стабилизаторы протеинов и индикаторный краситель | 1 фл<br>3 мл   |

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |                |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|     | Консервант: ProClin 300 (0.5%)                                                                                                                                                                                                    |                |
| C2  | 100 мМЕ/мл калибратор – положительный контроль<br>Буферный раствор, содержащий человеческие антитела против HBs Ag, фетальную бычью сыворотку, стабилизаторы протеинов и индикаторный краситель<br>Консервант: ProClin 300 (0.5%) | 1 фл<br>2,2 мл |
| C3  | 400 мМЕ/мл калибратор<br>Буферный раствор, содержащий человеческие антитела против HBs Ag, фетальную бычью сыворотку, стабилизаторы протеинов и индикаторный краситель<br>Консервант: ProClin 300 (0.5%)                          | 1 фл<br>2,2 мл |
| C4  | 1000 мМЕ/мл калибратор<br>Буферный раствор, содержащий человеческие антитела против HBs Ag, фетальную бычью сыворотку, стабилизаторы протеинов и индикаторный краситель<br>Консервант: ProClin 300 (0.5%)                         | 1 фл<br>2,2 мл |
| R6  | Раствор для разведения образца<br>Буферный раствор, содержащий фетальную бычью сыворотку, стабилизаторы протеинов и индикаторный краситель<br>Консервант: ProClin 300 (0.1%)                                                      | 1 фл<br>27 мл  |
| R7a | Концентрат конъюгата (11X)<br>Буферный раствор, содержащий меченый пероксидазой HBs Ag человека (подтипы ad/ ay) и стабилизаторы протеинов<br>Консервант: ProClin 300 (0.5%)                                                      | 1 фл<br>2,5 мл |
| R7b | Раствор для разведения конъюгата<br>Буферный раствор, содержащий фетальную бычью сыворотку, стабилизаторы протеинов и индикаторный краситель<br>Консервант: ProClin 300 (0.1%)                                                    | 1 фл<br>25 мл  |
| R8  | Субстратный раствор<br>лимонная кислота и раствор ацетата натрия pH = 4.0, содержащий H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.015%) и DMSO (диметил сульфоксид) (4%)                                                                     | 1 фл<br>60 мл  |
| R9  | Хромоген<br>Раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ)                                                                                                                                                                          | 1 фл<br>5 мл   |
| R10 | Блокирующий реагент (стоп-раствор)<br>1N раствор серной кислоты                                                                                                                                                                   | 1 фл<br>28 мл  |
|     | Самоклеющаяся пленка в                                                                                                                                                                                                            | 8              |

\*Контрольные реагенты калиброваны в соответствии с внутренними нормативами, которые в свою очередь соответствуют нормам, рекомендованным I/RP ВОЗ от 1977 г.

Хранить комплект при +2-8°C. Перед использованием выдержать все реактивы кроме концентрированного конъюгата до комнатной температуры (+18-30°C). Охладить реактивы до +2-8°C сразу же после использования. Неиспользованные стрипы/планшеты упаковать и плотно закрыть пакет. Не удалять десикант. Хранить полоски планшета при +2-8°C.

##### 5 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

Качество полученных результатов зависит от соблюдения правил надлежащей лабораторной практики:

- Название теста и порядковый номер находятся на рамке каждого планшета, тот же номер указан на каждом стрипе.
- **MONOLISA Anti-HBs PLUS** : Идентификационный номер = 63
- Проверьте идентификационный номер перед использованием теста. При отсутствии идентификационного номера, или его несоответствии номеру, указанному выше, стрип не использовать.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте реагенты из различных партий при выполнении теста

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11x, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N,

красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 х голубого цвета или маркировка 10 х оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

- Для стабилизации реактивы следует выдерживать 30 мин. при комнатной температуре перед началом анализа.
- Аккуратно разведите реагенты, не допуская их загрязнения.
- Не проводить тест в присутствии паров кислот, щелочей, альдегида или пыли, что может изменить ферментативную активность конъюгата.
- Используйте только тщательно промытую и ополоснутую деионизированной водой стеклянную посуду или (предпочтительно) одноразовую посуду.
- Не допускайте пересыхания стрипов в промежутках между промывкой и добавлением следующего реактива.
- Ферментативные реакции очень чувствительны к присутствию металлов или ионов металлов. Ни при каких обстоятельствах не допускайте контакта растворов, содержащих субстрат или конъюгат с металлами.
- Смесь субстратного раствора и хромогена должна иметь розовую окраску. Изменение цвета в течение нескольких минут после приготовления раствора указывает на то, что реагент не может использоваться и должен быть заменен.
- Приготовление раствора может быть выполнено в чистой одноразовой пластиковой чашке или стеклянном контейнере, который предварительно был вымыт 1 N HCl, тщательно ополоснут дистиллированной водой и высушен. Данный реагент должен храниться в темном месте.
- Раствор индикатора можно приготовить в одноразовой пластиковой чашке или стеклянной
- Используйте новый наконечник пипетки для каждого образца.
- Одна из важнейших операций анализа - промывка лунок следуете рекомендациям по количеству промывочных циклов. Лунка должна полностью заполняться раствором, а затем полностью опорожняться. Несоблюдение правил промывки ведет к искажению результата.
- Используйте разные емкости для конъюгата и индикаторного раствора.

## 6 - ИНСТРУКЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:

**Xi** – класс химических препаратов вызывающих раздражение кожи, слизистой оболочки глаз, дыхательных путей.



Некоторые реагенты содержат ProClin 300 (0,04%; 0,1% и/или 0,5%) – препарат класса Xi.

R43: может вызвать сенсибилизацию кожных покровов.

S28-37: При попадании на кожные покровы, немедленно промойте места контакта большим количеством воды и мыла. Рекомендуется ношение соответствующей защитной одежды.

В состав некоторых реагентов диагностического набора Монолиза Анти-HBs ПЛЮС входят компоненты крови человека. Все они были проверены на наличие и не содержат, согласно результатам теста: поверхностного антигена ВГВ (HBs Ag), антител против вируса гепатита С (ВГС), и антител к ВИЧ (ВИЧ-1, ВИЧ-2-антитела). Ни один из существующих методов контроля биологических материалов не может дать полную гарантию того, что инфекционный агент отсутствует. Поэтому, работая с образцами, соблюдайте требования, предъявляемые к работе с контаминированными биоматериалами, которые могут служить источником передачи инфекции..

Все материалы, вступающие в контакт с образцами плазмы/крови или с реагентами, содержащими компоненты тканей человека, а также с промывочными растворами следует рассматривать как контаминированные.

Не допускайте разливания образцов или растворов содержащих образцы.

Используйте одноразовые перчатки для работы с реагентами и образцами. Тщательно мойте руки после окончания теста.

Не пипетируйте ртом.

Образцы, реагенты, содержащие компоненты тканей человека и все другие потенциально контаминированные материалы утилизируются только после предварительной деkontаминации.

- либо замачиванием материалов в 5% растворе гипохлорита натрия (1 объемная часть гипохлорита натрия на 10 частей загрязненной жидкости или воды) в течение 30 мин.,

- либо обработкой в автоклаве при 121°C в течение как минимум 2 часов.

Обработка в автоклаве при 121°C не менее, чем в течение 1 часа является лучшим способом дезактивации вирусов гепатита и ВИЧ.

**ВНИМАНИЕ: НЕ ДОПУСКАЙТЕ ПОПАДАНИЯ РАСТВОРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГИПОХЛОРИТ НАТРИЯ В АВТОКЛАВ**

Поверхности, загрязненные образцами обработать 10% раствором гипохлорита натрия. Если загрязненные жидкости содержат кислоту, то загрязненные ими участки поверхности следует нейтрализовать бикарбонатом натрия, а затем обработать раствором хлорной извести и просушить промокатальной бумагой. Материалы, использованные при обработке, поместить в емкость для загрязненных отходов.

• Не забудьте нейтрализовать и/или обработать в автоклаве растворы и любые жидкости, содержащие биологически активные образцы перед тем, как слить их в канализацию. Инструкцию по безопасному применению (MSDS) перечисленных реагентов имеется в наличии у производителя

#### **7 – ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:**

- Дистиллированная или деионизованная вода.
- Гипохлорит натрия (хлорная известь) и бикарбонат натрия.
- Автоматическая/полуавтоматическая многоканальная пипетка с переменным или фиксированным объемом 10 мкл, 200 мкл, 1 мл, 5 мл, 10 мл.
- Мерный цилиндр на 25 мл, 100 мл, и 1000 мл.
- Контейнер для загрязненных материалов.
- Водяная баня или сухой инкубатор с температурным режимом 37°C ± 1°C.
- Автоматическая, полуавтоматическая или ручная система для промывки микропланшетов.
- Фотометр для микропланшетов с-фильтрами на 490, 450 и 620 – 650 нм.
- Промокательная бумага.
- Одноразовые перчатки.
- Чистый полипропиленовый контейнер для приготовления ТМБ.

#### **8 - ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ:**

Перед использованием набор Монолиза Анти-HBs ПЛЮС выдержать при комнатной температуре 30 мин для стабилизации реагентов.

##### **1) Реагенты готовые к употреблению**

##### **Микропланшеты (R1)**

Каждый микропланшет состоит из 12 стрипов, установленных в рамке. Он упакован герметично в пакет, который снабжен замком-клипсой. Перед вскрытием упаковки выдержите планшет в пакете при комнатной температуре, во избежание появления конденсата в лунках планшета. Рассеките пакет ножницами или скальпелем на 0,5-1 см выше линии клипсы. Откройте его и достаньте планшет. Неиспользованные стрипы положите в пакет, запечатайте и храните при +2 – 8 °C.

##### **Раствор для разведения образцов (R6)**

##### **Отрицательный контрольный образец (C0)**

##### **10 мМЕ/мл калибратор (C1)**

##### **100 мМЕ/мл калибратор - положительный контрольный образец (C2)**

##### **400 мМЕ/мл калибратор (C3)**

##### **1000 мМЕ/мл калибратор (C4)**

Перед использованием гомогенизировать раствор посредством автоматического встряхивателя, или осторожно переворачивая флакон.

##### **2) Реагенты, требующие приготовления**

##### **Концентрат промывающего раствора (R2)**

Разбавить концентрированный раствор для промывки R2 дистиллированной водой в соотношении 1:20, перемешать. Для промывки 12 стрипов достаточно 800 мл промывочного раствора в рабочей концентрации.

##### **Рабочий раствор конъюгата (R7a + R7b)**

Выдержать раствор для разведения конъюгата (R7b) при комнатной температуре.

Перед приготовлением смеси раствор для разведения конъюгата (P7b, бесцветный или бледно-соломенно-желтый) и концентрат конъюгата (R7a, зеленого цвета) гомогенизировать, аккуратно переворачивая флакон.

Приготовить в чистой полипропиленовой пробирке рабочий раствор в отношении 1:11 в объеме, учитывающем количество используемых стрипов (например, добавить 100 мкл концентрированного конъюгата (R7a) на каждый 1 мл раствора для (R7b)). Необходимое количество реагентов приведено в таблице. Тщательно перемешать, соблюдая осторожность, избегая образования пены.

Рабочий раствор конъюгата должен храниться в темном месте при комнатной температуре или при +2 - 8°C.

Рабочий раствор конъюгата должен быть зеленого цвета. Раствор остается стабильным в течение 8 часов при комнатной температуре и в течение 2 недель при +2 - 8°C.

Рабочий раствор конъюгата можно приготовить, перенеся с помощью пипетки, содержимое флакона с концентратом конъюгата (R7a) во флакон с раствором для разведения конъюгата (R7b). Рабочий раствор непосредственно перед употреблением всегда следует гомогенизировать, переворачивая флакон. Неиспользованный остаток концентрата конъюгата (R7a) поместить в холодильник сразу же после использования.

Во избежание контаминации конъюгата, пользуйтесь чистыми перчатками и не прикасайтесь к наконечникам пипеток.

**Количество рабочего раствора конъюгата необходимое при использовании указанного количества полосок**

| Количество стрипов                     | 1   | 2   | 3*  | 4*  | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   | 11   | 12*  | 24** |
|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| Объем Концентрата Конъюгата R7a(мкл)   | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 | 1100 | 1200 | 2400 |
| Объем раствора для разведения R7b (мл) | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   | 11   | 12   | 24   |

\*1 полный планшет \*\*2 полных планшета

#### Рабочий раствор хромогена (R8+R9)

Выдержать хромоген (R9) и субстратный раствор (R8) при комнатной температуре.

Перед приготовлением смеси реагенты гомогенизировать, аккуратно переворачивая флакон..

Развести хромоген (R9) буферным раствором субстрата (R8) в пропорции 1:11 в объеме, учитывающем количество стрипов (например: добавить 1 мл реагента R9 к 10 мл реагента R8). 10 мл необходимо и достаточно для постановки реакции в 1-12 стрипах. Гомогенизировать..

Перед употреблением рабочий раствор хромогена осторожно размешать. Выдержать 5 минут перед употреблением. Рабочий раствор хромогена можно использовать в течение 8 часов от момента приготовления при хранении в темном месте при комнатной температуре.

Хромоген (R9) имеет розовый цвет. Изменение цвета указывает на контаминацию раствора: в этом случае реагент использовать нельзя. Количество рабочего раствора хромогена можно рассчитать с учетом объема исследований в течение ближайших 6 часов или приготовить объем, достаточный для выполнения одного теста, руководствуясь следующей таблицей:

**Количество разведенного рабочего раствора хромогена в зависимости от количества стрипов**

| Количество стрипов                  | 1   | 2   | 3*  | 4*  | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   | 11   | 12*  | 24** |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| Объем хромогена R9 (мкл)            | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 | 1100 | 1200 | 2400 |
| Объем субстратного раствора R8 (мл) | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   | 11   | 12   | 24   |

\*1 полный планшет \*\*2 полных планшета

## 9 - УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СРОК ГОДНОСТИ

Набор следует хранить при +2-8 °С. При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе «Монолиза® AgHBs УЛЬТРА» может быть использован до даты, указанной на упаковке (кроме реагентов, указанных ниже).

- R1 : После вскрытия вакуумной упаковки стрипы можно использовать в течение 1-го месяца, сохраняя их в аккуратно запечатанном пакете при +2 - 8 °С.
- R2 : Разведенный раствор для промывания может храниться в течение 2 недель после приготовления при +2-30°C. Концентрат промывочного раствора (R2) может храниться при +2 - 30 °С до окончания срока годности.
- R7a + R7b : Рабочий раствор конъюгата должен храниться в темном месте при комнатной температуре (+18-30°C) или при температуре +2-8°C. После приготовления рабочий раствор конъюгата может быть использован в течение 8 часов при хранении в условиях комнатной температуры (+18-30°C) и в течение 2 недель при хранении при температуре +2-8°C.
- R8 + R9 : После приготовления рабочий раствор хромогена остается стабильным в течение 6 часов при хранении в темноте при комнатной температуре (+18-30°).

Все остальные реагенты остаются стабильными после вскрытия до окончания срока годности, указанного на упаковке тест-системы в условиях хранения при +2 - 8 °С.

## 10 – ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие крови для исследования осуществляется в соответствии с общепринятыми стандартами.

В качестве материала для исследования используется плазма или сыворотка крови. При клинических испытаниях сопоставлялись результаты, полученные для следующих образцов: сыворотка, собранная в стандартную пробирку или в пробирку с разделяющим гелем, плазма, собранная в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) или с гепарином. При исследовании плазмы, собранной в пробирки с цитратом или ацетатом декстрозы (ACD), результат анализа оказывается ниже на 20% по сравнению с исследованиями, проведенными на сыворотке.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, перед тестированием необходимо отцентрифугировать. Взвешенные частицы фибрина и его комплексов могут стать причиной ложноположительного результата.

Образцы сыворотки/плазмы хранят при темп +2-8°C, если предполагается проведение тестирования в течение 7 дней или замораживают при -20°C. Избегайте повторного замораживания/оттаивания образцов. Не используйте образцы, подвергнутые замораживанию и размораживанию более 3 раз. При необходимости транспортировки образцов, произвести упаковку в соответствии с правилами транспортировки инфицированных материалов и контаминирующих веществ. Образцы желательно транспортировать в замороженном виде.

**ПОЯСНЕНИЕ:** содержание в образцах до 90 г/л альбумина и 100 мг/л билирубина не влияет на результат теста. Результат теста не искажается при тестировании образцов, с повышенным содержанием липидов (до 36 г/л в триглицеридовом эквиваленте) или образцов с признаками гемолиза (до 2,55 г/л гемоглобина).

Образцы плазмы/сыворотки не пригодны для тестирования после нахождения при температуре +56°C более 30 минут.

## 11 – ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Строго следуйте предложенной процедуре. При каждом тестировании используйте положительный/отрицательный контроль для проверки качества проведения исследования. Соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики.

### Методика

1. Подготовьте схему внесения и идентификации исследуемых образцов
2. Перед началом исследования, выдержите все реагенты при комнатной температуре.
3. Приготовьте рабочий раствор конъюгата (R7a + R7b), рабочий раствор хромогена (R8 + R9) и необходимое разведение промывающего раствора (разведенный R2).
4. Извлеките штатив и стрипы микропланшета (R1) из защитной упаковки. Уберите лишние стрипы и при необходимости замените их стрипами, имеющими обозначение Null Strips.
5. Разведите образцы плазмы/сыворотки, растворы калибраторов и контрольные образцы в пропорции 3:4 в растворе для разведения образцов (R6) по одной из двух нижеприведенных схем:
  - а. Образцы, калибраторы и контроли можно разводить непосредственно в лунках (сначала добавьте 25 мкл раствора для разведения образцов (R6) в каждую лунку, затем, в течение 15 мин., добавьте 75 мкл образца или контроля и осторожно перемешайте, по крайней мере дважды аспирруя содержимое лунок пипеткой, избегая вспенивания).

6. Можно приготовить образцы до внесения их в лунки: развести калибраторы и контроли в пропорции 3:4 в растворе для приготовления образцов (R6) (например: развести 150 мкл образца в 50 мкл реагента (R6), осторожно перемешать, чтобы избежать вспенивания отобрать 100 мкл полученного раствора и перенести его в лунку).

*Примечание: при добавлении сыворотки розовый цвет раствора для разведения изменится на голубой цвет. Наличие образца в лунке можно проконтролировать с помощью спектрофотометра на длине волны 620 нм (Смотри часть 14: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)*

6. В зависимости от вида анализа без предварительного промывания микропланшета в лунки добавить следующее:

Для качественного анализа

- отрицательный контрольный образец (C0) в лунку A1,
- 10 мМЕ/мл калибратор (C1) в лунки B1, C1, D1,
- 100 мМЕ/мл калибратор - положительный контрольный образец (C2) в лунку E1,
- тестируемые образцы в лунки F1, G1, и т.д.

Для количественного анализа:

- отрицательный контрольный образец (C0) в лунку A1,
- 10 мМЕ/мл калибратор (C1) в лунки B1, C1,
- 100 мМЕ/мл калибратор - положительный контроль (C2) в лунку D1,
- 400 мМЕ/мл калибратор (C3) в лунку E1,
- 1000 мМЕ/мл калибратор (C4) в лунку F1,
- Тестируемые образцы в лунки G1, H1, и т.д.

В зависимости от используемого оборудования расположение контрольных образцов и порядок их внесения в лунки микропланшета может быть изменен.

7. Плотно накройте планшет самоклеющейся пленкой по всей поверхности для обеспечения герметичности.

8. Инкубируйте в термостате  $60 \pm 5$  мин при температуре  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ .

9. Удалите пленку. С помощью пипетки удалите содержимое лунок в емкость для жидких отходов. Немедленно в каждую лунку добавьте как минимум 0.375 мл промывающего раствора, через 30 – 60 сек. удалите содержимое лунки. Повторить цикл промывания 4 раза (мин. всего 5 промываний). Между циклами промывки оставляйте раствор в лунках на 30-60 сек. Остаточный объем жидкости в лунке не должен превышать 10 мкл (при необходимости просушите планшет, перевернув его и поместив на промокательную бумагу)

10. При использовании автоматического промывающего устройства процедуру промывки проводите по той же схеме.

11. Быстро добавьте 100 мкл рабочего раствора конъюгата (R7a + R7b) в каждую лунку. Накройте планшет чистой пленкой и инкубируйте в течение  $60 \pm 5$  мин. при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

*ПРИМЕЧАНИЕ: Раствор конъюгата имеет зеленый цвет. Наличие конъюгата в лунках можно проконтролировать спектрофотометром на длине волны 620 нм (См часть 14 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПИПЕТИРОВАНИЯ ОБРАЗЦА И РЕАГЕНТОВ).*

12. Удалите пленку. помощью пипетки удалите содержимое лунок в емкость для жидких отходов. Немедленно в каждую лунку добавьте как минимум 0.375 мл промывающего раствора, через 30 – 60 сек. удалите содержимое лунки. Повторить цикл промывания 4 раза (мин. всего 5 промываний). Между циклами промывки оставляйте раствор в лунках на 30-60 сек. Остаточный объем жидкости в лунке не должен превышать 10 мкл (при необходимости просушите планшет, перевернув его и поместив на промокательную бумагу)

13. При использовании автоматического промывающего устройства процедуру промывки проводите по той же схеме.

14. Быстро добавьте 100 мкл разведенного рабочего раствора хромогена (R8 + R9) в каждую лунку. Поместите планшет в темное место на  $30 \pm 5$  минут при комнатной температуре  $+18-30^{\circ}\text{C}$ . Во время этой процедуры не накрывайте планшет пленкой.

*ПРИМЕЧАНИЕ: Раствор разведенного рабочего раствора субстрата имеет розовый цвет. Наличие конъюгата в лунках можно проконтролировать спектрофотометром на длине волны 490 нм (См часть 14 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПИПЕТИРОВАНИЯ ОБРАЗЦА И РЕАГЕНТОВ).*

15. Добавить 100 мкл блокирующего реагента (стоп-раствора) (R10), соблюдая ту же последовательности что и при добавлении раствора хромогена (пункт 14). Гомогенизируйте содержимое лунок.

16. Осторожно протрите дно планшета. Измерить оптическую плотность растворов на длине волн 450/620-700 нм и 405/620-700 нм не ранее, чем через 4 мин после остановки реакции и в течение не более чем 30 мин.

Перед записью результатов убедитесь в соответствии между полученными данными и планом размещения образцов в лунках микропланшета и идентификации образцов.

## 12 – КРИТЕРИИ ПРАВИЛЬНОСТИ ВЫПОЛНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Среднее значение оптической плотности 10 мМЕ/мл Калибратора (C1), является пороговым значением оптической плотности (cutoff) для данного теста.

### Для отрицательного контроля (C0)

Значение оптической плотности должно быть более 0.000 и меньше или равно 0.070 ( $0.000 < ОП(C0) \leq 0.070$ ).

### Для положительного контроля (C2)

Измеренная оптическая плотность должна быть больше или равна 0.400 ( $ОП(C2) \geq 0.400$ )

Если одно из вышеперечисленных условий для отрицательного контроля (C0) и положительного контроля (C2) не выполнено: результаты теста считаются недействительными и исследование следует повторить.

### Для 10 мМЕ/мл калибратора (C1)

Значение оптической плотности должно находиться в интервале от 0.050 до 0.200 ( $0.050 \leq ОП \leq 0.200$ ).

Значение оптической плотности для каждой лунки, содержащей C1 должно быть больше или равно 1,5 оптической плотности (ОП) отрицательного контроля (C0):  $ОП(C1) \geq 1,5 \times ОП(C0)$ .

### Для качественного анализа

Если одно из измеренных значений оптической плотности порогового (Cutoff) калибратора 10 мМЕ/мл (C1) не соответствует установленным пределам (значение оптической плотности должно находиться в пределах от 0.050 до 0.200), то это значение следует исключить и средняя оптическая плотность вычисляется на основании результатов двух оставшихся измерений. Результаты теста считаются действительными.

Если несколько результатов измерения ОП (C1) оказались вне приведенных выше пределов для ОП, то результаты теста считаются недействительным и исследование необходимо повторить.

### Для количественного анализа:

Если результаты одного или двух измерений ОП (C1) не соответствует установленному пределу (значение оптической плотности должно быть больше или равно 0.050 и меньше или равно 0.200), результаты теста считаются недействительным и тест требуется повторить.

## 13 - РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА

Вывод о наличии или отсутствии антител к HBs делается на основании сравнения оптической плотности исследуемого образца с расчетной пороговой (cutoff) оптической плотностью.

### 1. Качественный анализ

Рассчитайте среднее значение оптической плотности для 10 мМЕ/мл калибратора (C1)

Пример: 10 мМЕ/мл калибратор (C1)

|         |       |
|---------|-------|
| B1      | 0.078 |
| C1      | 0.079 |
| D1      | 0.089 |
| Сумма = | 0.246 |

Среднее значение ОП (C1)<sub>ср.</sub> =  $0.246 / 3 = 0.082$

Если одно из измеренных значений оптической плотности не соответствует установленному пределу (оптическая плотность должна быть больше или равна 0.050 и меньше или равна 0.200), то среднее значение оптической плотности вычисляется на основании результатов двух других измерений.

### Пороговое значение оптической плотности (ОП<sub>кр.</sub>)

Пороговое значение оптической плотности равно средней оптической плотности 10 мМЕ/мл калибратора (C1):

ОПкр. = Среднее значение ОП (С1)

#### Интерпретация результатов теста:

Если значение ОП образца больше или равно пороговому значению ОП (ОПкр.), то результат считается положительным.

Если ОП образца меньше, чем пороговая ОП, то результат считается отрицательным.

Если ОП образца превышает максимальный линейный предел спектрофотометра, то результат считается положительным.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** В связи с большим разнообразием антител и антигенов, используемых в различных методах ИФА, результаты исследований могут различаться между собой в зависимости от конкретного метода.

Рекомендации по проведению вакцинаций зависят от области и страны проживания.

При изменении метода тестирования в период наблюдения и контроля после вакцинации, количество Анти-НВс антител у привитых лиц во время переходного периода определяется с помощью нового и старого метода.

#### 2. Количественный анализ

Для количественного определения концентрации анти-НВс антител в образцах плазмы и сыворотки крови человека должны быть использованы следующие калибраторы (в скобках указано содержание анти-НВс): С0 (0 мМЕ/мл), С1 (10 мМЕ/мл), С2 (100 мМЕ/мл), С3 (400 мМЕ/мл) и С4 (1000 мМЕ/мл). Калибраторы вносятся непосредственно в лунки микропланшета без предварительной процедуры промывки, по завершению процедуры анализа (гл. 11 Инструкции) измеряется оптическая плотность с помощью двухлучевого фотометра на длине волн 450/620-700 нм.

Если в результате измерения при 450 нм, оптической плотности (А450) в некоторых образцах превышает или равно значению ОП(С3):  $A450 \geq ОП(С3)$ , для этих образцов измерения производятся на длине волны 405/620-700 нм.

С помощью метода регрессии полиномом 2-й степени строится график зависимости оптической плотности (А450) четырех калибровочных растворов С0, С1, С2 и С3 от их концентрации.

Обратите внимание, что значение ОП(С4) (1000 мМЕ/мл) не может быть использовано при построении этого графика, так как значение ОП в данном случае выходит за пределы диапазона спектрофотометра, что требует построения второго графика. Значения оптической плотности образцов, меньшие, чем значения ОП(С3), интерпретируются с помощью графика, полученного для А450 четырех калибраторов.

Оптическую плотность калибраторов С3 и С4 измеряют на длине волны 405/620-700 нм. Значения ОП (А405) для калибраторов С3 (400 мМЕ/мл) и С4 (1000 мМЕ/мл) наносятся на график прямо напротив точек, соответствующих их концентрациям. Затем точки соединяются между собой прямой линией. Значение концентрации анти-НВс антител (мМЕ/мл) для каждого образца находят на пересечении значения ОП для данного образца с графиком. График зависимости ОП от концентрации для длины волны 405 нм (А405) используют для определения концентрации антител против ВГВ в образцах сыворотки или плазмы, если указанная концентрация больше 400 мМЕ/мл и меньше или равна 1000 мМЕ/мл. Образцы, содержащие анти ВГВ антитела в концентрации, превышающей 1000 мМЕ/мл, разводят в предварительно разведенном до рабочей концентрации промывочном растворе (разведенном R2) и исследуют повторно.

#### 14 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦА И КОНЬЮГАТА

Проверка правильности внесения образцов и раствора для разведения (R6).

После добавления образца, цвет раствора для разведения изменяется с розового на голубой.

Наличие раствора для разведения образца и образца плазмы/сыворотки в лунке может быть проконтролировано с помощью спектрофотометра на длине волны 620 нм. Значение ОП для каждой лунки, содержащей разведенный образец или контроль, должно быть больше или равно 0,150 (значение меньше 0,150 указывает на ошибку, допущенную при дозировании образца или контроля).

Проверка правильности внесения раствора конъюгата (R7a + R7b) в рабочей концентрации

Рабочий раствор конъюгата (R7a + R7b) окрашен зеленый цвет.

Наличие конъюгата в лунке можно проверить с помощью спектрофотометра на длине волны 620 нм. Значение ОП для каждой лунки должно быть больше или равно 0,070 (значения ниже 0,070 указывает на ошибку, допущенную при дозировании рабочего раствора конъюгата).

Проверка правильности внесения раствора хромогена (R8+R9) в рабочей концентрации

Разбавленный рабочий раствор хромогена (R8+R9) имеет розовый цвет.

Наличие раствора (R8+R9) в лунке можно проконтролировать при помощи спектрофотометра при длине волны 490 нм. При этом значение ОП раствора в лунке должно быть больше 0,100 (если ОП

меньше 0.100, то это указывает на ошибку, допущенную при дозировании разбавленного рабочего раствора хромогена). Перед добавлением рабочего раствора хромогена (R8+R9) пустая лунка бесцветна. После добавления рабочего субстратного раствора, содержимое лунки розового цвета.

## 15 - ОГРАНИЧЕНИЯ

- Необходимо строго соблюдать порядок проведения и интерпретации результатов анализа плазмы/сыворотки на наличие антител к поверхностному антигену ВГВ. Рекомендуется внимательно изучить инструкцию перед тем, как приступить к исследованию. Особенно важно точное выполнение указаний по внесению образцов и реагентов, промывке микропланшет и соблюдении условий инкубации.

- Ошибки, допущенные при добавлении образцов или реагентов, могут стать причиной ложно отрицательных результатов.

Если есть сомнения в качестве выполнения теста, рекомендуется повторить анализ.

- Причины, по которым не выполняются условия валидности результатов тестирования, могут быть следующие: отсутствие образца в лунке, небрежная промывка микропланшета, несоблюдение времени/температуры инкубации, нарушение порядка внесения реагентов, присутствие металлов в лунках или при попадании в них брызг раствора хлорной извести.

- К интерпретации слаболожительных результатов необходимо подходить с особой осторожностью, принимая во внимание существенные межличностные различия в иммунологических реакциях, а также изменения иммунитета у пациентов, перенесших ВГВ или привитых против гепатита, а также у лиц после введения иммуноглобулинов с лечебными целями.

## 16 - ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

При испытаниях теста Монолиза Анти-НВс ПЛЮС были получены следующие результаты. Данные, полученные в других лабораториях, могут отличаться от нижеприведенных.

1. Воспроизводимость результатов в одной постановке: 5 положительных и один отрицательный образец были протестированы 10 раз в трех экземплярах внутри одной серии.

| Образец                             | ОП (450) | Среднеквадратичное отклонение | CV%(коэффициент вариации) |
|-------------------------------------|----------|-------------------------------|---------------------------|
| Отрицательный                       | 0,023    | 0,003                         | 3,6                       |
| Положительный Анти-НВс - 20 мМЕ/мл  | 0,143    | 0,005                         | 3,4                       |
| Положительный Анти-НВс - 50 мМЕ/мл  | 0,358    | 0,012                         | 3,3                       |
| Положительный Анти-НВс - 100 мМЕ/мл | 0,715    | 0,019                         | 2,6                       |
| Положительный Анти-НВс - 150 мМЕ/мл | 1,231    | 0,037                         | 3,0                       |
| Положительный Анти-НВс - 300 мМЕ/мл | 1,982    | 0,048                         | 2,4                       |

2. Воспроизводимость результатов между независимыми постановками:

Тестировались 1 отрицательный и 3 положительных образца в дублях 2 раза в день на протяжении 20 дней в соответствии с процедурой, рекомендованной Национальным Комитетом по Клиническим Лабораторным Стандартам (EP5 - NCCLS).

| Образец                               | ОП(450) | Среднеквадратичное отклонение | CV%(коэффициент вариации) |
|---------------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------|
| Отрицательный к Анти-НВс              | 0,023   | 0,004                         | 15,5                      |
| Положительный к Анти-НВс - 20 мМЕ/мл  | 0,146   | 0,008                         | 5,5                       |
| Положительный к Анти-НВс - 150 мМЕ/мл | 1,284   | 0,060                         | 4,9                       |
| Положительный к Анти-НВс - 300 мМЕ/мл | 2,015   | 0,067                         | 3,6                       |

## 3. Точность

Результаты количественного анализа представлены в мМЕ/мл и откалиброваны при соблюдении нормативов компании-производителя соответствующих нормам 1<sup>st</sup> IRP WHO Reference Standard 1977. Был проведен сравнительный анализ результатов тестирования контрольных растворов с концентрациями 0, 10, 100, 400, и 1000 мМЕ/мл, соответствующих международным стандартам

ВОЗ и калибровочных растворов данной тест-системы. Коэффициент корреляции составил  $R^2 = 0,99$  и коэффициент угла наклона регрессионной линии:  $a = 0,96$ .

4. Аналитическая чувствительность данного теста  $\leq 2$  мМЕ/мл согласно процедуре, рекомендованной NCCLS.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Аналитическая чувствительность (нижний предел детекции) соответствует минимальной концентрации анализируемого вещества, отличимой от нулевого калибратора, рассчитанной на основании среднего значения и величины стандартного отклонения (SD), полученных при исследовании растворов с концентрациями анализируемого вещества 0 и 10 мМЕ/мл

5. Линейность метода

5 образцов, содержащих антитела к HBs в высокой концентрации (924 мМЕ/мл, 330 мМЕ/мл, 326 мМЕ/мл, 544 мМЕ/мл и 857 мМЕ/мл) последовательно разводились до 1/32 и 1/64 (коэффициент разведения кратный 2). Результат линейной аппроксимации находился в интервале от 92% до 116%.

6. Эффект высокой концентрации антител в образце (Hook effect)

4 неразбавленных образца с высокой концентрацией антител к HBs (200000 мМЕ/мл, 5500 мМЕ/мл, 28000 мМЕ/мл и 9000 мМЕ/мл) прошли тестирование.

| Концентрация | 200000 мМЕ/мл  | 28000 мМЕ/мл   | 9000 мМЕ/мл    | 5500 мМЕ/мл    |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ОП на 450    | Считано на 405 | Считано на 405 | Считано на 405 | Считано на 405 |
| ОП на 405    | 1,342          | 1,596          | 1,629          | 1,310          |
| Результат    | >1000 мМЕ/мл   | >1000 мМЕ/мл   | >1000 мМЕ/мл   | >1000 мМЕ/мл   |

Отображение эффект избытка антител при расчетах.

7. Специфичность

А) Образцы 179 пациентов с различными заболеваниями и патологическими состояниями (ВГА, ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2, Т-лимфотропный вирус человека, ЭБВ, ВГЧ, краснуха, токсоплазмоз, миелома (IgG, IgM), ревматоидный фактор (РФ), антинуклеарные антитела, цирроз и пациенты, прошедшие многократное переливание крови) исследовались с помощью теста Монолиза Анти-HBs ПЛЮС.

Для 21 образца были получены положительные результаты при использовании Монолиза Анти-HBs ПЛЮС и двух других коммерческих тестов на антитела к HBs (имеющих CE сертификат) были получены положительные результаты. 1 образец, содержащий антинуклеарные антитела, был определен как реактивный только при тестировании с помощью ИФА Монолиза Анти-HBs ПЛЮС.

2 образца, (положительные по ВИЧ-1 и ВИЧ-2) были определены как положительные по анти-HBs антителам во всех 3-х ИФА тестах.

Б) Специфичность Монолиза Анти-HBs ПЛЮС оценивалась при исследовании донорской крови и клинических образцов от пациентов с диагнозом, отличным от гепатита В.

|                              | Кровь доноров и пациентов | Кровь доноров | Кровь пациентов | Всего |
|------------------------------|---------------------------|---------------|-----------------|-------|
| Число образцов               | 511                       | 300           | 240             | 1051  |
| Число положительных образцов | 3                         | 0             | 3               | 6     |
| % специфичности              | 99,4%                     | 100%          | 98,7%           | 99,4% |

Специфичность 99,4% (от 98,8% до 99,8%, доверительный интервал 95%).

8. Чувствительность

654 образца, полученных от вакцинированных или инфицированных ВГВ лиц, исследовались в тесте Монолиза Анти-HBs ПЛЮС и другой тест-системы для выявления анти-HBs антител. Образцы, для которых имело место несовпадение результатов, полученных посредством этих двух тестов были повторно исследованы с помощью третьей ИФА тест-системы (CE сертификат).

| Информация пациента | Количество | Совпадение с результатами Монолиза Анти-HBs ПЛЮС |                  |
|---------------------|------------|--------------------------------------------------|------------------|
|                     |            | 1 тест (CE)                                      | 2 тест (CE)*     |
| Вакцинация          | 347        | 98,8%                                            | 99,1%            |
| Излеченный Геп.В    | 71         | 95,8%                                            | 100%             |
| Хронический Геп.В   | 37         | 100%                                             | Не тестировались |

|                              |     |       |                  |
|------------------------------|-----|-------|------------------|
| Госпитализированные Пациенты | 199 | 98,6% | Не тестировались |
| Всего                        | 654 | 98,5% | 99,5%            |

Из 654 образцов проанализированных с помощью 1-го ИФА теста - 617 положительных к антителам к HBs, 37 отрицательных (пациенты с хроническим Геп. В). Для положительных образцов соответствие составило 98,4% (от 97% до 99,2% с доверительным интервалом - 95%).

\*Чувствительность Монолиза Анти-HBs ПЛЮС после дополнительного анализа с помощью теста 2 составила 99,2% (98,1% до 99,7% с доверительным интервалом - 95%).

## 17. ЛИТЕРАТУРА

См. французскую версию.

**МОНОЛИЗА HBe Ag-At ПЛЮС****72346****MONOLISA HBe Ag-Ab PLUS****96 тестов HBe Ag - 96 тестов HBe At**

---

**Набор для выявления антигена HBe вируса гепатита «В» и анти-HBe антител в сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа**

---

**Для использования в диагностике In Vitro****Контроль качества производителя**

*Все производимые и реализуемые реагенты контролируются полноценной системой контроля качества от этапа получения сырья до этапа конечной реализации продукта.*

*Каждая партия подвергается контролю качества и выпускается на рынок только после подтверждения ее соответствия критериям приемки продукции.*

*В нашей компании хранится вся необходимая документация по производству и контролю качества каждой партии продукции.*

## **СОДЕРЖАНИЕ:**

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 - НАЗНАЧЕНИЕ .....</b>                                                                   | <b>3</b>  |
| <b>2 - КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:.....</b>                                                       | <b>3</b>  |
| <b>3 - ПРИНЦИП ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА:.....</b>                                                     | <b>3</b>  |
| <b>4 – СОСТАВ НАБОРА.....</b>                                                                 | <b>4</b>  |
| <b>6 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....</b>                                                        | <b>5</b>  |
| <b>7- ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.....</b>                                                           | <b>6</b>  |
| <b>8 – ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ .....</b>                                                      | <b>7</b>  |
| <b>9 – СРОК ГОДНОСТИ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ.....</b>                                    | <b>8</b>  |
| <b>10- ОБРАЗЦЫ .....</b>                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>11– МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.....</b>                                                   | <b>9</b>  |
| <b>12– РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>                                            | <b>12</b> |
| <b>13- СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ<br/>ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ. ....</b> | <b>13</b> |
| <b>14- ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ТЕСТ-СИСТЕМЫ.....</b>                                       | <b>14</b> |

## 1- НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «МОНОЛИЗА® HBe Ag-Ат ПЛЮС» предназначена для определения в сыворотке или плазме крови человека антигена HBe гепатита В (HBe Ag) или анти-HBe антител с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА).

## 2 - КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:

Присутствие HBe Ag отражает состояние активной репликации вируса и указывает на то, что образец крови исследуемого лица обладает инфекционной активностью. HBe Ag появляются на начальной стадии заражения гепатитом В, а их персистенция (более одного месяца) - является фактором риска для поражения печени при репликации вируса. Появление анти-HBe антител вызывает угнетение репликации вируса и является благоприятным прогностическим признаком.

## 3 - ПРИНЦИП ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА:

### а) Выявление антигенов HBe

Выявление HBe Ag основано на двухэтапном иммуноферментном анализе в «сэндвич» формате с использованием человеческих антител против HBe Ag и 2-х типов мышинных моноклональных антител анти HBe (mab1 и mab2), меченных пероксидазой, против различных эпитопов HBe.

Твердая фаза представлена 8-ми луночными полистироловыми стрипами, лунки которых покрыты анти-HBe антителами человеческой природы.

Анализ состоит из следующих этапов:

1. Инкубация контрольных и исследуемых образцов с анти- HBe антителами, в составе иммуносорбента.
2. Промывка, инкубация иммобилизованных комплексов с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой.
3. Удаление свободного конъюгата путем промывки, развитие ферментативной хромогенной реакции при добавлении субстрата.
4. Остановка цветной реакции, регистрация оптической плотности при длине волны 450/620 - 655 нм, интерпретация результатов.

### б) Выявление анти-HBe антител

Для выявления анти-HBe антител используется тот же иммуносорбент, что и для выявления HBe Ag. Тест использует метод конкурентного ИФА и основан на конкуренции иммобилизованных антител и антител, присутствующих в исследуемом образце. В качестве нейтрализующего реагента используется ограниченное количество HBe Ag. Детекция осуществляется путем добавления моноклональных антител, меченных пероксидазой (mab1 и mab2). Анализ состоит из следующих этапов:

1. Инкубация контрольных и исследуемых образцов с анти-HBe антителами, нанесенными на твердую фазу, и нейтрализующим агентом.
2. Промывка, инкубация иммобилизованных комплексов с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой.
3. Удаление свободных конъюгатов в процедуре промывки, развитие ферментативной реакции при добавлении субстрата.
4. Остановка цветной реакции, регистрация оптической плотности при 450/620 - 655 нм.
5. Интерпретация результатов.

#### 4 – СОСТАВ НАБОРА

Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для диагностики *in vitro*. Реагенты предоставляются в количестве, необходимом для проведения 2 x 96 исследований в 1 - 12 независимых постановках в следующих комбинациях:

96 определений HBe Ag и 96 определений анти-HBe антител  
2 x 48 HBe Ag определений и 2 x 48 анти HBe определений одновременно.

| МАРКИРОВКА | СОСТАВ РЕАГЕНТОВ                                                                                                                                                                                                                                                                            | ФОРМА ВЫПУСКА      |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| R1         | Иммуносорбент: разборный планшет, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок, фиксированных в рамке. Для сорбции планшета использованы инактивированные человеческие анти-HBe антителами (из положительного образца плазмы крови инактивированного по HBs Ag)                                       | 2 планшета         |
| R2         | Промывочный раствор концентрированный(20x)<br>Трис-NaCl буфер, pH=7,4<br>Консервант: Proclin 300 (0.04%)                                                                                                                                                                                    | 1 флакон<br>235 мл |
| R3         | ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ – общий для тестов на наличие HBe Ag и анти-HBe антител.<br>Человеческая сыворотка, отрицательная по анти-HBs, анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС антителам<br>Консервант: 0,1 % азид натрия                                                                 | 1 флакон<br>8 мл   |
| R4         | ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ПО АНТИ-HBe АТ КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ<br>Дефибринированная положительная на анти-HBe антителам человеческая плазма, потенциально положительная на HBs Ag и отрицательная по содержанию антител анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС, инактивированная. Консервант: 0,1 % азид натрия. | 1 флакон<br>1,5 мл |
| R5         | ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ПО HBe АГ КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ<br>Дефибринированная положительная на HBe Ag и HBs Ag человеческая плазма, отрицательная по содержанию антител анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС, инактивированная. Консервант: 0,1 % азид натрия.                                                | 1 флакон<br>1,5 мл |
| R6         | НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЙ РЕАГЕНТ (HBe АНТИГЕН)<br>Дефибринированная положительная на HBe Ag и HBs Ag человеческая плазма, отрицательная по содержанию антител анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС, инактивированная.<br>Консервант: 0,1 % азид натрия                                                     | 1 флакон<br>8 мл   |
| R7a        | КОНЬЮГАТ ДЛЯ АНТИ-HBe ТЕСТА КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ (5X)<br>Анти-Hbe моноклональные антитела (maб1 и maб2)*, отмеченных пероксидазой                                                                                                                                                              | 1 флакон<br>3 мл   |
| R7b        | КОНЬЮГАТ ДЛЯ HBe АГ ТЕСТА (КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ 5X)<br>Анти-Hbe моноклональные антитела (maб1 и maб2)*, отмеченных пероксидазой                                                                                                                                                                | 1 флакон<br>3 мл   |
| R8         | СУБСТРАТНЫЙ РАСТВОР<br>Лимонная кислота и уксуснокислый натрий pH 4.0, содержащий H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (перекись водорода) (0.015 %) и DMSO (4%)                                                                                                                                   | 1 флакон<br>60 мл  |
| R9         | ХРОМОГЕН<br>Раствор, содержащий триметилбензол (ТМБ)                                                                                                                                                                                                                                        | 1 флакон<br>5 мл   |
| R10        | СТОП-РЕАГЕНТ<br>1 N Серная кислота                                                                                                                                                                                                                                                          | 1 флакон<br>28 мл  |
|            | ПУСТОЙ ФЛАКОН ДЛЯ R2 В РАБОЧЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ                                                                                                                                                                                                                                                 | 1 флакон 25 мл     |
|            | Самозакрывающаяся пленка для микропланшет                                                                                                                                                                                                                                                   | 8                  |

\*Соотношение maб1 и maб2 отличается для конъюгатов R7a и R7b. Не смешивайте конъюгаты друг с другом

## 5 – НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дистиллированная, либо полностью деионизированная вода.

Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия.

Промокательная бумага.

Одноразовые перчатки.

Одноразовые полистироловые пробирки (12 x 75 мм).

Ручные или полуавтоматические пипетки (микродозаторы) с регулируемым или фиксированным объемом предназначенные для отбора и распределения жидкостей объемом 50  $\mu$ л, 100  $\mu$ л, 200  $\mu$ л и 1 мл.

Мерные цилиндры: 10 мл, 50 мл, 100 мл, 1000 мл.

Лабораторная мешалка вихревого типа (Вортекс).

Контейнеры для опасных биологических отходов.

Ручной, полуавтоматический или автоматический промыватель (вошер)\* для микропланшет.

Водяная баня или термостат\* с температурой  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Спектрофотометр, оснащенный фильтрами\* на 450 и 620 - 655 нм.

(\*) *Всю необходимую информацию о рекомендованном оборудовании Вы можете узнать в нашем Техническом отделе.*

## 6 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Качество результатов зависит от выполнения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices):

Не смешивайте и не используйте в одном и том же исследовании реагенты из разных партий;

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11х, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 х голубого цвета или маркировка 10 х оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

Название тест-системы и специфический идентификационный номер теста нанесен на рамке каждого микропланшета. Специфический идентификационный номер также нанесен на каждом стрипе.

**«Монолиза® HBe Ag-Ат ПЛЮС» : Специфический ID номер = 56.**

Перед использованием набора проверьте идентификационный номер. Если идентификационный номер отсутствует или номер на стрипе не соответствует

идентификационному номеру этот стрип использовать нельзя.

Не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

Перед использованием необходимо подождать 30 минут, пока состояние реагентов не стабилизируется при комнатной температуре, и один час после разведения концентрата промывочного раствора R2.

При приготовлении реагентов избегайте возможности контаминации;

Не проводите исследования в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или при сильном запылении воздуха в лаборатории так, как это может повлиять на ферментативную активность конъюгата;

перед использованием стеклянной посуды тщательно промойте ее и ополосните деионизованной водой, предпочтительнее использовать одноразовую посуду.

Не допускайте пересыхания микропланшета во период между завершением промывки и распределением реагентов.

Используйте новый наконечник пипетки для дозирования каждого образца.

Промывка лунок – важный этап данной процедуры: соблюдайте рекомендуемое число циклов промывки, убедитесь, что все лунки полностью заполнены, а затем полностью опустошены. Неправильная промывка может привести к искажению результатов.

Не используйте одну и ту же емкость для работы с конъюгатом и раствором для ферментативной реакции;

Проверьте состояние пипеток или другого оборудования для обеспечения точности и правильности их работы.

Не изменяйте процедуру проведения анализа.

Раствор для ферментативной реакции (субстратный раствор + хромоген) должен быть розового цвета. Изменение розового цвета в течение нескольких минут после приготовления раствора указывает на то, что его нельзя использовать и следует заменить. Приготовление раствора для ферментативной реакции должно производиться в пластиковых одноразовых лотках или в стеклянных контейнерах, которые следует предварительно промыть 1N раствором HCl, тщательно прополоскать дистиллированной водой и высушить. Реагенты следует хранить в темноте;

## 7- ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты набора предназначены для диагностики "in vitro".

Надевайте одноразовые перчатки при работе с реагентами и исследуемыми пробами и тщательно мойте руки после завершения анализа.

Используйте только автоматические пипетки для дозирования жидкостей.

Материалы человеческого происхождения, используемые при подготовке реагента R3 (отрицательный контрольный образец) были исследованы и не дали положительную реакцию по отношению к поверхностному антигену гепатита В (HBs Ag), антителам вирусов иммунного дефицита (анти-ВИЧ1 и анти-ВИЧ2).

Материал человеческого происхождения, используемый при подготовке R1 (микропланшет), при исследовании не дал положительную реакцию по отношению к антителам вируса человеческого иммунодефицита (анти-ВИЧ1 и анти-ВИЧ2) и к антителам против вируса гепатита С (анти-ВГС). Была получена положительная реакция по отношению к поверхностному антигену гепатита В (HBs Ag) и материал был фотохимически инактивирован.

Материал человеческого происхождения, используемый при подготовке R4 (контроль положительного на анти-HBe образца), R5 (контроль положительного на HBe Ag образца) и R6 (нейтрализующий реагент HBe Ag) при исследовании не дал

положительную реакцию по отношению к антителам вируса человеческого иммунодефицита (анти-ВИЧ1 и анти-ВИЧ2) и антителам к вирусу гепатита С (анти-ВГС). Материалы R5 и R6 при исследовании дали положительную реакцию по отношению к поверхностному антигену гепатита В (HBs Ag). Материал для реагента R4 потенциально содержит HBs Ag. Материал был фотохимически инактивирован.

Поскольку ни один из известных методов исследования не может полностью гарантировать отсутствие инфекционных агентов, с реагентами и биологическими образцами следует обращаться, как с материалами потенциально способными к переносу инфекции.

Любое оборудование, находившееся в непосредственном контакте с биологическими образцами и реагентами, также как и промывочные растворы, должны рассматриваться как контаминированные и требуют соответствующего обращения.

Избегайте пролива биопроб и растворов, содержащих пробы.

Поверхность должна быть промыта от пролитой жидкости 10% раствором гипохлорида натрия. Если разлита кислота, ее необходимо вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия и высушить промокательной бумагой. Материал, использованный для чистки следует выбрасывать в специальный контейнер для контаминированных отходов.

Пробы и реагенты человеческого происхождения, также как и загрязненный материал должны быть утилизированы после деконтаминации:

- либо замачиванием в 5 % растворе гипохлорида натрия (1 часть раствора на 10 частей загрязненной жидкости или воды) в течение 30 минут;
- или автоклавированием при 121°C минимум в течение 2-х часов. Автоклавирование — лучший метод инактивации ВИЧ и вирусов гепатита В и С.

## НЕ ПОМЕЩАЙТЕ В АВТОКЛАВ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ

Не забудьте нейтрализовать и/или автоклавировать растворы или моющие жидкости, содержащие биологические пробы, перед их сливом в канализацию.

Реагенты требуют соответствующего обращения и должны быть утилизированы в соответствии с правилами Good Laboratory Practices.

Избегайте любого контакта субстратного раствора, хромогена и стоп-раствора с кожей и слизистыми оболочками (возможно отравление, воспаление и ожоги).

Некоторые реагенты содержат азид натрия в качестве Консерванта. Известно, что азид натрия способен формировать азиды свинца или меди в водопроводе лаборатории, что является взрывоопасным. Для предотвращения образования азидов, инактивируйте соединения, содержащие азид натрия перед тем, как слить их в раковину. Если в раковину выливались растворы, содержащие азид, промывайте большим количеством воды.

Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество ProCfin™ 300 (0,04 %; 0,1 % и/или 0,5 %), который может вызывать раздражение кожи и слизистых



R43: может вызывать раздражение кожи при контакте.

S28/37: после контакта с кожей промойте участок контакта большим количеством воды с мылом. При работе используйте защитные перчатки.

## 8 – ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Перед использованием, выдержать реагенты при комнатной температуре (18 - 30°C)

**Микропланшет (R1) - иммуносорбент**

12 стрипов в рамке, упакованных герметично в пакет, снабженный замком-клипсой. Рассеките пакет ножницами или скальпелем на 0,5 – 1 см выше линии клипсы. Откройте его и достаньте планшет. Неиспользованные стрипы положите в пакет, тщательно запечатайте и храните при +2 – 8 °C.

**Промывочный раствор (концентрат x20): Реагент R2 (R2):**

Разведите концентрат в дистиллированной воде в соотношении 1:20, чтобы получить готовый к употреблению промывочный раствор. На один стрип необходимо 75 мл раствора в рабочей концентрации.

**Концентрированный конъюгат анти -HBe (R7a)**

Разведите раствор R7a приготовленным раствором R2 в соотношении 1:5, в соответствии с количеством используемых стрипов:

| Число используемых стрипов | Объем R7a (мл) | Конечный объем вместе с приготовленным R2 (мл) |
|----------------------------|----------------|------------------------------------------------|
| 1                          | 0.2            | 1                                              |
| 2                          | 0.4            | 2                                              |
| 3                          | 0.6            | 3                                              |
| 4                          | 0.8            | 4                                              |
| 5                          | 1              | 5                                              |
| 6                          | 1.2            | 6                                              |
| 7                          | 1.4            | 7                                              |
| 8                          | 1.6            | 8                                              |
| 9                          | 1.8            | 9                                              |
| 10                         | 2              | 10                                             |
| 11                         | 2.2            | 11                                             |
| 12                         | 2.4            | 12                                             |

Перемешайте.

Конъюгат R7a может быть использован в его исходном состоянии без предварительного разбавления в соответствии с следующей процедурой:

добавьте 80 µл разбавленного промывочного раствора (R2) к 20 µл Анти-HBe конъюгата R7a. Перемешайте.

**Концентрированный конъюгат Ag HBe (R7b):**

Используйте ту же процедуру, что и для конъюгата R7a.

**Раствор для ферментативной реакции (R8+R9):**

Разбавьте реагент (R9) 1:11, используя реагент R8 (например: 1 мл реагента R9 на 10 мл реагента R8).

Гомогенизируйте.

10 мл необходимо и достаточно для 1-10 стрипов.

**9 – СРОК ГОДНОСТИ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ**

Набор следует хранить при +2-8 °C. При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе «Монолиза® AgHBs УЛЬТРА» может быть использован до даты, указанной на упаковке.

**R1:** После вскрытия вакуумной упаковки стрипы могут быть использованы в течение 1-го месяца в аккуратно запечатанном пакете.

**R2:** Разведенный промывочный раствор может быть использован в течение 2-х недель.

при +2 – 30 °С. Концентрат промывочного раствора может храниться при +2 – 30 °С.  
R7a: после приготовления конъюгат для исследования анти-HBe, хранящийся при +2 – 8 °С, может быть использован в течение 1 месяца после приготовления. При хранении при комнатной температуре (18 – 30 °С) остается стабильным в течение 8 часов.  
R7b: после приготовления конъюгат для исследования HBe Ag, хранящийся при +2 – 8 °С, может быть использован в течение 1 месяца после приготовления. При хранении при комнатной температуре (18 – 30 °С) остается стабильным в течение 8 часов.  
R8 + R9: После приготовления реагент может быть использован в течение 6 часов при комнатной температуре (18 – 30 °С) в темном месте.

## 10- ОБРАЗЦЫ

Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранный с ЭДТА, гепарином, цитратом, антикоагулянтами на основе ACD). При отделении сыворотки или плазмы от сгустка крови или эритроцитов следует избегать гемолиза. Выраженный гемолиз может повлиять на результаты теста. Если в исследуемых образцах присутствуют посторонние включения, пробы следует отцентрифугировать перед проведением анализа. Присутствующие в образце частицы фибрина или сгустки могут давать ложноположительные результаты. Образцы должны храниться при +2 °С - +8 °С, если исследование будет выполняться не позднее 7 дней с момента взятия образца, или хранить в замороженном состоянии при температуре – 20 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

Если образцы необходимо транспортировать, упакуйте их в соответствии с правилами для транспортировки агентов, обладающих инфекционной опасностью; перевозите их предпочтительно в замороженном состоянии.

**НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ЗАГРЯЗНЕННУЮ, ГИПЕРЛИПЕМИЧЕСКУЮ ИЛИ ГЕМОЛИЗИРОВАННУЮ СЫВОРОТКУ КРОВИ.**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Образцы, содержащие до 100 мг/л билирубина, липемические образцы, содержащие липиды до 36 г/л в триолеиновом эквиваленте, и гемолизированные образцы, содержащие до 2.5 мг/мл гемоглобина, являются пригодными для исследований.

Снижение показателей наблюдалось для негативных образцов при добавлении 45 мг/мл альбумина.

## 11- МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

В случае одновременного определения анти-HBe и HBe Ag на одном планшете, вносите образцы и реагенты по следующей схеме:

Анти-HBe тест: используйте ряды 1 - 6

HBe Ag тест: используйте ряды 7 - 12

**а) Процедура проведения теста на определение анти-HBe антител.**

1. Подготовьте рабочую концентрацию промывочного раствора.
2. Извлеките один или несколько стрипов из герметичной упаковки. Положите неиспользуемые полоски назад в упаковку и вновь закройте ее.
3. Добавьте в лунки:

A1, B1, C1 : 100 µл отрицательного контрольного образца (R3)

D1 : 100 µл положительного контрольного образца (R4)

E1, F1, G1 и т.д.: по 100 µл исследуемых образцов

В зависимости от используемой технологии можно менять позиции контрольных

образцов в соответствии с порядком внесения.

**ВНИМАНИЕ:** Существует четкое цветовое различие по цвету между пустой лункой и лункой с образцом, окрашенной в желтый цвет. Проверить наличие в лунке образца можно при помощи спектрофотометрического анализа при длине волны 490 нм (одна длина волны). Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

4. Быстро добавьте 50  $\mu$ л нейтрализующего HBe- антиген раствора R6 в каждую лунку. Перемешайте содержимое лунок.

Герметизируйте планшет самоклеющейся пленкой и инкубируйте в течение 3 часов  $\pm$  10 минут при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**ВНИМАНИЕ:** Дозирование нейтрализующего раствора (R6), окрашенного в розовый цвет, может быть проконтролировано визуально на данном этапе теста. Наличие нейтрализующего HBe-антигена в лунке можно проверить при помощи спектрофотометрического анализа на одной длине волны 490 нм. Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

5. До завершения инкубации на этапе 4 протокола подготовьте раствор конъюгата R7a в рабочей концентрации.
6. Удалите самоклеющуюся пленку. Тщательно удалите содержимое лунок в контейнер для контаминированных отходов, промойте лунки планшета 4 раза.
7. Быстро внесите 100  $\mu$ л разбавленного раствора конъюгата R7a (См. раздел 8: ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ) в каждую лунку. Может быть использован конъюгат R7a в концентрированном виде по следующей процедуре: сначала внесите 80  $\mu$ л разбавленного промывочного раствора (R2) в каждую лунку, затем добавьте 20  $\mu$ л конъюгата Анти-HBe, R7a (5X). Гомогенизируйте содержимое.

Накройте клейкой пленкой и выдержите в термостате в течение 30 минут при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (минимум 25 минут, максимум 40 минут). Удалите самоклеющуюся пленку, Тщательно удалите содержимое лунок в контейнер для контаминированных отходов, промойте лунки планшета 5 раз.

**ВНИМАНИЕ:** Наличие в лунке разбавленного раствора конъюгата R7a, окрашенного в фиолетовый цвет, может быть проконтролировано визуально на данном этапе теста. Можно проверить наличие разбавленного раствора конъюгата R7a в лунке при помощи спектрофотометрического анализа на одной длине волны 620 нм. Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

8. Непосредственно перед использованием подготовьте раствор для ферментативной реакции (R8 + R9). Смотри раздел 8: ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ.

9. Быстро внесите 80  $\mu$ л раствор для ферментативной реакции (R8 + R9) в каждую лунку. Поместите планшет на 30 минут  $\pm$  5 минут в темное место при температуре (+18 -  $30^{\circ}\text{C}$ ).

**ВНИМАНИЕ:** Внесение раствора для ферментативной реакции, окрашенного в розовый цвет, может быть проконтролировано визуально на данном этапе теста. Существует четкое различие между пустой лункой и лункой содержащей раствор розового цвета. Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

10. Быстро добавьте 100  $\mu$ л стоп-раствора (R 10) в каждую лунку.

**ВНИМАНИЕ:** Внесение бесцветного стоп-раствора может быть

проконтролировано визуально на данном этапе теста. После добавления стоп-раствора в лунки с отрицательными образцами, их содержимое из розового цвета становится бесцветным, для положительных образцов голубое содержимое лунки становится желтым.

11. Тщательно протрите дно планшета. Измерьте оптическую плотность при 450/620 - 655 нм, не ранее чем через 4 минуты после добавления ингибирующего раствора и в течение не более 30 минут после прекращения реакции.

**b) Процедура проведения теста для определения HBe Ag:**

1. Подготовьте промывочный раствор.
2. Извлеките один или несколько стрипов из герметичной упаковки. Положите неиспользуемые полоски назад в упаковку и вновь закройте ее
3. Добавьте в лунки:  
A1, B1, C1 : 100  $\mu$ л отрицательного контрольного образца (R3)  
D1 : 100  $\mu$ л положительного контрольного образца (R5)  
E1, F1, G1 : 100  $\mu$ л исследуемого образца

**ВНИМАНИЕ:** Существует четкое цветовое различие по цвету между пустой лункой и лункой с образцом, окрашенной в желтый цвет. Проверить наличие в лунке образца можно при помощи спектрофотометрического анализа при длине волны 490 нм (одна длина волны). Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

4. Герметизируйте планшет самоклеющейся пленкой и инкубируйте в течение 3 часов  $\pm$  10 минут при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
5. До завершения инкубации на этапе 4 протокола подготовьте раствор конъюгата R7a в рабочей концентрации.
6. Удалите самоклеющуюся пленку. Тщательно удалите содержимое лунок в контейнер для контаминированных отходов, промойте лунки планшета 4 раза.
7. Быстро внесите 100  $\mu$ л разбавленного раствора конъюгата R7b (См. раздел 8: ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ) в каждую лунку. Может быть использован конъюгат R7b в концентрированном виде по следующей процедуре: сначала внесите 80  $\mu$ л разбавленного промывочного раствора (R2) в каждую лунку, затем добавьте 20  $\mu$ л конъюгата HBe Ag, R7b (5X). Гомогенизируйте содержимое.

**ВНИМАНИЕ:** Внесение разбавленного раствора конъюгата R7b, бирюзового цвета, может быть проконтролировано визуально на данном этапе теста. Можно проверить наличие разбавленного раствора конъюгата R7b в лунке при помощи спектрофотометрического анализа на одной длине волны 620 нм. Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

8. Непосредственно перед использованием подготовьте раствор для ферментативной реакции (R8 + R9).
9. Быстро распределите 80  $\mu$ л раствора для ферментативной реакции (R8 + R9) в каждую лунку. Поместите планшет на 30 минут  $\pm$  5 минут в темное место при комнатной температуре ( $+18 - 30^{\circ}\text{C}$ ).

**ВНИМАНИЕ:** Внесение раствора для ферментативной реакции, окрашенного в розовый цвет, может быть проконтролировано визуально на данном этапе теста. Существует четкое различие между пустой лункой и лункой содержащей раствор розового цвета. Обратитесь к разделу 13 - СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.

10. Быстро добавьте 100  $\mu$ л стоп-раствора (R10) в каждую лунку.

**ВНИМАНИЕ:** Внесение бесцветного стоп-раствора может быть

проконтролировано визуально на данном этапе теста. После добавления стоп-раствора в лунки с отрицательными образцами, их содержимое из розового цвета становится бесцветным, для положительных образцов голубое содержимое лунки становится желтым.

11. Тщательно протрите дно планшета. Измерьте оптическую плотность при 450/620 - 655 нм, не ранее чем через 4 минуты после добавления ингибирующего раствора и в течение не более 30 минут после прекращения реакции.

с) Одновременное проведение тестов на определение анти-HBe и HBe Ag (на одном планшете):

Исследование проводится согласно протоколу, который был описан выше. Отличается только схема распределения образцов:

Тест на определение Анти-HBe: ряды 1 - 6

Тест на определение HBe Ag: ряды 7 - 12

## 12 – РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

а) Тест на определение Анти-HBe

1. Расчет среднего значения оптической плотности (ОП) отрицательного контрольного образца: (ОП R3) ср.

|         |                           |       |
|---------|---------------------------|-------|
| Пример: | R3 Отрицательный контроль | ОП    |
|         | 1                         | 1.607 |
|         | 2                         | 1.410 |
|         | 3                         | 1.552 |
|         | Сумма ОП=                 | 4.569 |

Среднее значение (ОП R3) ср. = Сумма ОП / 3 = 4.569 / 3 = 1.523

Если значения ОП R3 отличается от среднего значения (ОП R3) ср. более, чем на 25 %, оно должно быть исключено из расчета. Из вычисления среднего может быть исключено не более одного значения ОП R3. Пересчитайте (ОП R3) ср. для двух оставшихся значений.

2. Расчет критического значения оптической плотности (ОП Крит., Cut-off).

Для каждого планшета критическое значение ОП рассчитывается по формуле:

ОП Крит. = (ОП R3)ср. x 0.4

Пример:

(ОП R3)ср. = 1.523

ОП Крит. = 1.523 x 0.4 = 0.609

3. Оценка достоверности результатов анализа анти-HBe

(ОП R3)ср. > 0.900

ОП R4 < 0.150

4. Расчет коэффициента реактивности (R)

Для каждого образца коэффициент реактивности рассчитывается по следующей формуле:

$R = \text{ОП образца} / \text{ОП Крит.}$

5. Интерпретация результатов

Результаты исследования интерпретируются следующим образом:

Положительные, если коэффициент реактивности меньше либо равен 0.9 ( $R \leq 0.9$ )

Отрицательные, если коэффициент реактивности больше 1.1

( $R > 1.1$ )

Если результат находится в пределах от 0.9 до 1.1, необходимо сделать повторное определение анти-НВе в соответствующих образцах.

Рекомендуется осуществить повторное тестирование первично положительных сывороток в дублирующих образцах. После проведения повторного теста, если, по крайней мере, один результат будет положительный, сыворотка рассматривается, как положительная.

#### б) Тест на определение НВе Ag

#### 1. Расчет среднего значения оптической плотности (ОП) отрицательных контрольных образцов: (ОП R3)ср.

|          |                           |       |
|----------|---------------------------|-------|
| Пример : | R3 Отрицательный контроль | ОП    |
|          | 1                         | 0.023 |
|          | 2                         | 0.022 |
|          | 3                         | 0.026 |
|          | Сумма ОП =                | 0.071 |

(ОП R3)ср. = Сумма ОП / 3 =  $0.071 / 3 = 0.024$

Если значения ОП R3 отличается от среднего значения (ОП R3) ср. более, чем на 25 %, оно должно быть исключено из расчета. Из вычисления среднего может быть исключено не более одного значения ОП R3. Пересчитайте (ОП R3) ср. для двух оставшихся значений.

#### 2. Расчет критического значения оптической плотности (ОП Крит., Cut-off).

Для каждого планшета критическое значение ОП рассчитывается по формуле:

ОП Крит. = (ОП R3)ср. + 0.025

Пример:

(ОП R3)ср. = 0.024

ОП Крит. =  $0.024 + 0.025 = 0.049$

#### 3. Оценка достоверности результатов анализа для НВе Ag

(ОП R3)ср. < 0.060

ОП R5 > 0.800

#### 4. Расчет коэффициента реактивности (R)

Для каждого образца коэффициент реактивности рассчитывается по следующей формуле:

$R = \text{ОП образца} / \text{ОП Крит.}$

#### 5. Интерпретация результатов

Результаты исследования интерпретируются следующим образом:

Положительный, если коэффициент реактивности больше или равен 1 ( $R \geq 1$ )

Отрицательный, если коэффициент значения меньше 1 ( $R < 1$ )

Если результат находится в пределах от 0.9 до 1.1, необходимо сделать повторное определение анти-НВе в соответствующих образцах.

Рекомендуется осуществить повторное тестирование первично положительных сывороток в дублирующих образцах. После проведения повторного теста, если, по крайней мере, один результат будет положительный, сыворотка рассматривается, как положительная.

### 13- СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ ВНЕСЕНИЯ

## **ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ.**

### **1 Определение анти-НВе**

#### **Образцы и контроли**

Наличие образцов и контролей в лунках может быть проверено при помощи спектрофотометрии при длине волны 490 нм. Каждая лунка, содержащая контрольный образец, должна иметь ОП больше 0.050.

#### **Нейтрализующий реагент - антигена НВе (R6)**

Наличие нейтрализующего антигена НВе в лунке может быть проверено при помощи спектрофотометрии при 490 нм с вычислением разницы ОП ( $\Delta$ ОП) до и после внесения нейтрализующего реагента.

$\Delta$ ОП = (ОП<sub>490</sub> образца (или контроля) после добавления R6) - (ОП<sub>490</sub> образца (или контроля) до добавления R6)

$\Delta$ ОП должна быть больше 0.150.

#### **Конъюгат (R7a)**

Наличие разведенного конъюгата R7a в лунке может быть проверено при помощи спектрофотометрии при длине волны 620 нм. Значение ОП в каждой лунке должно быть больше или равно 0.070 и меньше или равно 0.200.

#### **Раствор для ферментативной реакции (R8 + R9)**

Наличие раствора для ферментативной реакции в лунке может быть проверено при помощи спектрофотометрии при длине волны 490 нм.

Значение ОП в каждой лунке должно быть больше 0.100.

### **2 Определение НВе Ag**

#### **Образцы и контроли**

Наличие образцов и контролей в лунках может быть проверено при помощи спектрофотометрии при 490 нм. Каждая лунка, содержащая контрольный образец, должна иметь ОП больше 0.050.

#### **Наличие концентрированного конъюгата (R7b) при проведении анализа на определение Ag НВе**

Наличие разбавленного конъюгата R7b в лунке может быть проверено при помощи спектрофотометрии при 620 нм. Значение ОП в каждой лунке должно быть больше либо равно 0.210.

#### **Наличие индикаторного раствора, (R8 + R9)**

Наличие индикаторного раствора в лунке может быть проверено при помощи спектрофотометрии при 490 нм.

Значение ОП в каждой лунке должно быть больше 0.100.

## **14- ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

Исследования характеристик теста «МОНОЛИЗА® НВе Ag-Ат ПЛЮС», результаты которого кратко изложены ниже, были произведены в двух исследовательских центрах с использованием в качестве образцов крови доноров, пациентов и сероконверсионных панелей.

### **1 – Определение НВе Ag**

#### **Специфичность**

Специфичность, исследованная на образцах крови 200 доноров, отобранных случайным образом, составила 100% [98.51 - 100 %], (IC95).

Специфичность, оцененная на образцах пациентов, составила 100% [99.28 - 100 %] (IC95, 416/416 образцов).

Анализ 195 пациентов с заболеваниями и патологическими состояниями, не связанными с гепатитом В (беременность, ревматоидный фактор, выявление антиядерных антител, а также другие вирусные или бактериальные инфекции), показал

специфичность в 99.49% [97.18 - 99.99%] (IC 95, 194/195 отрицательные образцы).

#### Аналитическая чувствительность

Предел чувствительности теста был оценен как 0.64 IU/мл [0.49 - 0.84] (IC 95) по стандарту PEI.

#### Чувствительность

Чувствительность исследовали на 203 положительных образцах, взятых от пациентов с хронической инфекцией ВГВ и на коммерческих сероконверсионных панелях. Чувствительность метода, показанная при исследовании данных образцов, составила 99.51% [97.29 - 99.99%] (IC 95, 202/203 образцы)

#### Воспроизводимость анализа

Воспроизводимость теста «МОНОЛИЗА® HBe Ag-Ат ПЛЮС» (анти-HBe Ag) была определена при анализе 4 образцов: 1 негативного образца, 1 положительного образца с низким содержанием HBe Ag, 1 положительного образца с высоким содержанием HBe Ag и 1 положительного образца со средним содержанием HBe Ag.

Воспроизводимость результатов в одной постановке (сходимость) была оценена на 4 образцах в 30 повторях. Межсерийную воспроизводимость оценивали в исследовании этих 4 образцов в двух повторях в течение 20 дней, с частотой по 2 а независимых исследованиях в день.

Результаты представлены в нижеследующих таблицах:

Таблица 1: Воспроизводимость в одном исследовании

| п = 30                            | образец 1 | образец 2 | образец 3 | образец 4 |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Среднее значение реактивности (R) | 3.56      | 5.29      | 27.24     | 45.56     |
| Среднеквадратичное отклонение     | 0.05      | 0.35      | 0.63      | 2.88      |
| CV (%)                            | 14.20     | 6.53      | 2.31      | 6.33      |

Таблица 2: Воспроизводимость между исследованиями

| п = 80                            | образец 1 | образец 2 | образец 3 | образец 4 |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Среднее значение реактивности (R) | 0.51      | 8.19      | 27.33     | 46.35     |
| Среднеквадратичное отклонение     | 0.12      | 1.17      | 3.26      | 4.98      |
| CV (%)                            | 23.86     | 14.27     | 11.92     | 10.74     |

## 2 - Тест на определение HBe Ab

#### Специфичность

Специфичность, исследованная на образцах крови 200 доноров, отобранных случайным образом, составила 100% [98.51 - 100 %], (IC95).

Специфичность, оцененная на 206 образцах пациентов, составила 98.54% [95.80 - 99.70 %], IC95 (203/206)..

При анализе 198 пациентов с заболеваниями и патологическими состояниями, не связанными с гепатитом В (беременность, ревматоидный фактор, выявление антиядерных антител, а также другие вирусные или бактериальные инфекции) в 3-х случаях выявились положительные результаты (2 образца с ВГС и 1 – с ревматоидным фактором). Специфичность теста, таким образом, при первичном исследовании составила 98.48% [95.64 - 99.69%] (IC 95, 195/198 отрицательные образцы). Данные образцы были исследованы повторно, образец, содержащий ревматоидный фактор был признан повторно реактивным. Два образца с ВГС при повторном исследовании показали отрицательный или неопределенный результат.

#### Чувствительность

Чувствительность была оценена на 220 положительных образцах, полученных с хронической инфекцией ВГВ и на коммерческих сероконверсионных панелях. Чувствительность метода, показанная при исследовании, составила 98.64% [96.07 - 99.72%] (IC 95, 217/220 образцы).

#### Воспроизводимость анализа

Воспроизводимость теста «МОНОЛИЗА® HBe Ag-At ПЛЮС» (анти-HBe At) была определена при анализе 4 образцов: 1 негативного образца, 1 положительного образца с низким содержанием анти-HBe, 1 положительного образца с высоким содержанием анти-HBe и 1 положительного образца со средним содержанием анти-HBe.

Воспроизводимость результатов в одной постановке (сходимость) была оценена на 4 образцах в 30 повторах. Межсерийную воспроизводимость оценивали в исследовании этих 4 образцов в двух повторах в течение 20 дней, с частотой по 2 а независимых исследованиях в день.

Результаты представлены в нижеследующих таблицах:

**Таблица 1: Воспроизводимость в одном исследовании**

| <b>n = 30</b>                     | <b>образец 1</b> | <b>образец 2</b> | <b>образец 3</b> | <b>образец 4</b> |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Среднее значение реактивности (R) | 3.15             | 0.69             | 0.42             | 0.03             |
| Среднеквадратичное отклонение     | 0.05             | 0.04             | 0.04             | 0.00             |
| CV (%)                            | 1.7              | 5.7              | 10.5             | 6.6              |

**Таблица 2: Воспроизводимость между исследованиями**

| <b>n = 80</b>                     | <b>образец 1</b> | <b>образец 2</b> | <b>образец 3</b> | <b>образец 4</b> |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Среднее значение реактивности (R) | 2.39             | 0.81             | 0.59             | 0.3              |
| Среднеквадратичное отклонение     | 0.23             | 0.077            | 0.09             | 0.01             |
| CV (%)                            | 9.6              | 9.5              | 14.5             | 39.3             |

## 15 – ЛИТЕРАТУРА

См. инструкцию на французском языке.

**BIO-RAD**

## **MONOLISA® anti-HCV PLUS** **МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС**

(ВЕРСИЯ 2)

**1 МИКРОПЛАНШЕТ 96 ТЕСТОВ**  
**5 МИКРОПЛАНШЕТ 480 ТЕСТОВ**

**72317**  
**72318**

---

**ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С МЕТОДОМ  
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ  
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

---



Для диагностики in vitro

*Контроль качества производителем*

*Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья и до продажи продукта пользователю.*

*Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям.*

*Документы о производстве и контроле каждой серии хранятся в компании БИО-РАД (BIO-RAD).*

**ООО «Био-Рад Лаборатории»**  
**125167 Москва, Ленинградский пр-т., 37А, корп. 14**  
**Бизнес-центр «Западный мост»**  
**Тел.: (495) 7211404, Факс:(495) 7211412, post @ bio-rad.ru**

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

- 1 – КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**
- 2 – ПРИНЦИП ТЕСТА**
- 3 – СОСТАВ НАБОРА**
- 4 – МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ**
- 5 – ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ**
- 6 – МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
- 7 – ОБРАЗЦЫ**
- 8 – ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ**
- 9 – МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**
- 10 – НАСТРОЙКА ОБОРУДОВАНИЯ**
- 11 – РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**
- 12 – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ**
- 13 – ОГРАНИЧЕНИЯ**
- 14 – ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**
- 15 – ЛИТЕРАТУРА**

## 1 - КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

МОНОЛИЗАФ® анти-ВГС ПЛЮС версии 2 - не прямой иммуноферментный анализ для выявления антител к вирусу гепатита С (НСV), определяемых в сыворотке или плазме пациентов.

## 2 - ПРИНЦИП ТЕСТА

МОНОЛИЗАФ® анти-ВГС ПЛЮС в качестве твердой фазы используются очищенные антигены: три рекомбинантных белка, вырабатываемых E.coli из клонов, отобранных из неструктурных участков генома вируса гепатита С (NS3 и NS4) и структурного участка генома вируса гепатита С. Выявление осуществляется с помощью козьих антител против IgG человека, очищенных с помощью аффинной хроматографии и конъюгированных с пероксидазой.

Проведение теста состоит из следующих этапов:

1. Исследуемая и контрольная сыворотки помещаются в лунки. При наличии антител к ВГС они связываются с антигеном на твердой фазе.

2. Антитела к IgG человека, меченые пероксидазой, добавляются после стадии промывки и связываются со специфическими антителами на твердой фазе.

3. После удаления несвязавшегося конъюгата комплекс антитело-антиген выявляется добавлением раствора субстрата.

4. После остановки реакции измеряют оптическую плотность с помощью спектрофотометра при 450/620 – 700 нм.

По величине поглощения судят о наличии или отсутствии антител к ВГС. Интенсивность цветной реакции пропорциональна количеству антител к ВГС, связанных на твердой фазе.

## 3 - СОСТАВ НАБОРА

| Метка | Наименование реагента                                                                                                                                                                          | Количество        |                      |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
|       |                                                                                                                                                                                                | 1 планшет         | 5 планшетов          |
| R1    | Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок, покрытых 3-мя рекомбинантными антигенами, специфичными для ВГС                                                                                            | 1                 | 5                    |
| R2    | Концентрат промывающего раствора (20х): 20-кратный концентрат - Трис NaCl буфер, pH 7.4<br>Консервант: ProClin™ 300 (0,04%)                                                                    | 1 флакон<br>70 мл | 1 флакон<br>235 мл   |
| R3    | Отрицательная контрольная сыворотка: сыворотка человека, отрицательная по HBs АГ и анти- ВИЧ1, ВИЧ2 и ВГС антителам.<br>Консервант: азид натрия (< 0,1%)                                       | 1 флакон<br>1мл   | 1 флакон<br>3мл      |
| R4    | Положительная контрольная сыворотка: сыворотка человека, содержащая антитела к ВГС, отрицательная по HBs АГ и по антителам к ВИЧ, инактивированная нагреванием. Консервант: азид натрия (0,1%) | 1 флакон<br>1мл   | 1 флакон<br>3мл      |
| R6    | Раствор для разведения образцов: фосфатный буфер с контрольным цветовым индикатором внесения образца.<br>Консервант: азид натрия (< 0,1%) и тиммерозал (0,01%)                                 | 1 флакон<br>15мл  | 2 флакона<br>2х40мл  |
| R7    | Конъюгат: козы антитела против IgG человека, меченые пероксидазой. Консервант: тиммерозал (0,01%)                                                                                              | 1 флакон<br>15мл  | 2 флакона<br>2х40мл  |
| R8    | Субстратный буфер пероксидазы: лимонная кислота и ацетат натрия, pH 4,0, содержащий 0,015% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 4% ДМСО.                                                            | 1 флакон<br>60мл  | 2 флакона<br>2х60мл  |
| R9    | Хромоген: раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ).                                                                                                                                        | 1 флакон<br>5 мл  | 2 флакона<br>2х5 мл  |
| R10   | СТОП-раствор: 1 Н серная кислота                                                                                                                                                               | 1 флакон<br>28мл  | 3 флакона<br>3х 28мл |
|       | Самоклеющаяся пленка для микропланшетов                                                                                                                                                        | 4                 | 12                   |

#### 4 - МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- Дистиллированная или деионизованная вода.
- Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия.
- Фильтровальная бумага.
- Защитные очки.
- Одноразовые перчатки.
- Одноразовые пробирки.
- Автоматические или полуавтоматические пипетки с постоянным и переменным объемом на 20, 80, 100, 200 и 1000 мкл.
- Мерные цилиндры на 10, 200 и 1000 мл.
- Встряхиватель типа VORTEX.
- Контейнер для загрязненных остатков.
- Водяная баня или суховоздушный инкубатор с контролируемым температурным режимом. (\*) на  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  или  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Вошер для промывки микропланшет (автоматический, полуавтоматический, ручной).(\*)
- Фотометр для микропланшетов (фильтры с длиной волны - 450/620 - 700 нм).(\*)

(\*) Обращайтесь в местное представительство компании за информацией о рекомендуемом оборудовании.

#### 5 - ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты, входящие в набор, предназначены для диагностики *in vitro*.
  - Используйте одноразовые перчатки при работе с реагентами и образцами и тщательно мойте руки после работы.
  - Не пипетируйте образцы и реагенты ртом.
  - Положительные контроли инактивируйте нагреванием.
  - Все донорские сыворотки, использованные для приготовления отрицательного контроля (R3), были протестированы на HBsAg и анти-ВНЧ-1, ВНЧ-2 и анти-ВГС антитела.
  - Все донорские сыворотки, использованные для приготовления положительного контроля (R4), были протестированы на HBsAg и анти-ВНЧ-1 и ВНЧ-2 антитела.
  - Ни один метод детекции не может гарантировать отсутствие или присутствие патогенных агентов (ВНЧ, ВГС, ВГВ и т.д.) в исследуемых образцах и реагентах человеческого происхождения. Следует рассматривать их как потенциально загрязненные и работать с соответствующими мерами предосторожности;
  - Считайте все оборудование, контактирующее с образцами, реагенты человеческого происхождения и промывающий раствор загрязненными;
  - Избегайте контакта субстратного буфера, хромогена и стоп-раствора с поверхностью кожи и слизистыми (возможно отравление, воспаление, ожоги);
  - Избегайте разбрызгивания образцов или растворов, содержащих образцы.
  - В случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоты, обработайте поверхности 10% раствором гипохлорида натрия, а затем фильтровальной бумагой, которую необходимо выбросить в контейнер для загрязненных остатков.
  - В случае разбрызгивания кислотосодержащих растворов нейтрализуйте их бикарбонатом натрия и обработайте раствором гипохлорида натрия и фильтровальной бумагой, которую необходимо выбросить в контейнер для загрязненных остатков.
  - Образцы и реагенты человеческого происхождения, как и загрязненные материалы следует выбрасывать после дезактивации:
    - замачиванием в растворе гипохлорида натрия в конечной концентрации не менее 5% в течение 30 минут.
    - или автоклавированием при  $121^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов.
- ВНИМАНИЕ! НЕ АВТОКЛАВИРУЙТЕ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ.**
- Избегайте попадания на кожу и слизистые субстратного буфера, хромогена, стоп-раствора.

- Международные сертификаты безопасности можно получить в Российском офисе Био-Рад по запросу.
- Не забывайте нейтрализовать и/или автоклавировать отходы после промывки микропланшет или любые жидкости, содержащие биологические образцы, до слива их в раковину.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Этот компонент может реагировать со свинцом и медью, образуя взрывоопасные соединения. Сливая в раковину, разводите остатки большим количеством воды во избежании их накопления в трубах.
- Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество 0,5 % ProClin™ 300: который может вызывать раздражение



R43: может вызывать раздражение кожи при контакте.

S28/37: после контакта с кожей промойте участок контакта большим количеством воды с мылом.

При работе используйте защитные перчатки.

## 6 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность тестирования зависит от правильного выполнения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practice):

- Не используйте реагенты по истечении срока их годности.
- Не смешивайте и не используйте в одном и том же тесте реагенты из разных серий.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11x, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 x голубого цвета или маркировка 10 x оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

- Выдержите реагенты при комнатной температуре в течение 30 минут перед началом использования.
- Тщательно разводите и перемешивайте реагенты, избегая контаминации.
- Не проводите тесты в присутствии активных испаряющихся веществ (кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгата.
- Используйте хорошо промытую посуду, ополоснутую дистиллированной водой, предпочтительней использовать одноразовую посуду.
- Не позволяйте микропланшету высыхать в промежуток между промыванием и внесением реагентов.
- Строго соблюдайте режим промывания и следите, чтобы промывающий раствор полностью заполнял все лунки и затем был полностью удален.
- Ферментативная реакция чрезвычайно чувствительна ко всем металлам и их ионам. Следовательно, не допускайте контакта растворов конъюгата и субстрата с металлами.
- Раствор для ферментативной реакции (субстратный буфер + хромоген) должен быть розовой окраски. Изменения окрашивания через несколько минут после приготовления раствора указывает на то, что реагент использовать нельзя, и его следует заменить. Для приготовления раствора для ферментативной реакции предпочтительнее использовать одноразовую посуду, или ее следует

предварительно промыть 1N раствором HCl, тщательно прополоскать дистиллированной водой и высушить. Готовый реагент следует хранить в темноте.

- Для каждой сыворотки используйте новые одноразовые наконечники.
- Правильная промывка – критический шаг в данной процедуре: соблюдайте рекомендуемое число промывочных циклов и удостоверьтесь в том, что все лунки полностью заполнены и затем полностью опорожнены. Неправильная промывка может привести к неточностям в результатах.
- Никогда не используйте одну и ту же посуду для конъюгата и раствора для ферментативной реакции.

## 7 - ОБРАЗЦЫ

Образцы крови собираются согласно существующим инструкциям. Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранной с антикоагулянтами на основе ЭДТА, цитрата, ACD или гепарина). Образцы сыворотки должны быть собраны с максимальной осторожностью во избежание гемолиза. Образцы, содержащие агрегаты перед исследованием следует отцентрифугировать. Взвешенные фибриновые агрегаты или частицы могут быть причиной ложноположительных результатов.

Если тестирование проводится менее, чем через 7 дней после взятия материала, образцы следует хранить при +2 – 8 °C или их можно заморозить при -20° C для длительного хранения. Избегайте повторного замораживания/оттаивания. Если образцы необходимо транспортировать, их следует упаковать в соответствии с правилами транспортировки загрязнированного материала. Предпочтительно транспортировать замороженные образцы.

**НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННЫЕ, ГИПЕРЛИПИМИЧЕСКИЕ И ГЕМОЛИЗИРОВАННЫЕ СЫВОРОТКИ.**

*ПРИМЕЧАНИЕ: Содержание в пробе до 90 г/л альбумина, 200 мг/л билирубина, липидов до 36 г/л в оптическом эквиваленте, до 1,25 г/л гемоглобина не влияет на результаты.*

## 8 - ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Перед использованием реагентов набора МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС версии 2 выдержите их при комнатной температуре в течение 30 минут.

### 1) Реагенты, готовые к использованию

#### HCV Ag микропланшет (R1)

Во избежании конденсации воды в лунках перед тем, как вскрыть упаковку микропланшета, выдержите его при комнатной температуре. Неиспользованные стрипы сразу же упакуйте, предварительно удалив воздух из пакета. Тщательно заклейте пакет липкой пленкой и храните при +2 – 8 °C.

#### Раствор для разведения образцов (R6)

Перед использованием переверните флакон вверх дном для гомогенизации раствора.

#### Конъюгат(R7)

Перед использованием переверните флакон вверх дном для гомогенизации раствора.

### 2) Реагенты, требующие приготовления

#### Моющий раствор R2 (20x)

Разведите моющий раствор R2 дистиллированной водой в соотношении 1:20. Для одного микропланшета из 12 стрипов необходимо 800 мл моющего раствора.

#### Раствор для ферментативной реакции (R8+R9)

Разведите реагент R9 в реагенте R8 в соотношении 1:11 (пример: 1 мл реагента R9 + 10 мл реагента R8). 10 мл необходимо и достаточно для 1-12 стрипов. Тщательно перемешайте.

### 3) Срок годности и стабильность

Набор следует хранить при  $+2-8^{\circ}\text{C}$ . При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе «Монолиза® анти-ВГС Плюс» может быть использован до даты, указанной на упаковке.

R1: После вскрытия вакуумной упаковки стрипы могут сохранять стабильность в течение 1-го месяца в аккуратно запечатанном пакете.

R2: Разведенный промывочный раствор стабилен в течение 2-х недель при  $+2 - +30^{\circ}\text{C}$ . Концентрат промывочного раствора может храниться при  $+2 - 30^{\circ}\text{C}$ .

R8 + R9: После приготовления реагент сохраняет устойчивость в течение 6 часов при комнатной температуре ( $18 - 30^{\circ}\text{C}$ ) в темном месте.

## 9 - МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- Строго соблюдайте инструкцию по выполнению теста.
- В каждом исследовании необходимо использовать положительный и отрицательный контроли для подтверждения выполнения требований по контролю качества анализа.
- Следуйте правилам «хорошей лабораторной практики» (GLP)
- Соблюдайте технику безопасности и меры предосторожности.

Для выявления анти-ВГС можно использовать одну из двух процедур:

|                        | Процедура 1                                                                      | Процедура 2               |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Инкубация образца      | $37\pm 1^{\circ}\text{C}$                                                        | $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ |
|                        | 60±5 минут<br>водяная баня/суховоздушный инкубатор                               |                           |
| Инкубация с конъюгатом | $37\pm 1^{\circ}\text{C}$                                                        | $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ |
|                        | 30±5 минут<br>водяная баня/суховоздушный инкубатор                               |                           |
| Ферментативная реакция | комнатная температура ( $18-30^{\circ}\text{C}$ )<br>30±5 минут (в темном месте) |                           |

1. Тщательно подготовьте таблицу распределения образцов, реагентов и их идентификации.

2. Приготовьте раствор для промывания.

3. Извлеките необходимое количество стрипов (R1) из упаковки.

4. Внесите реагенты в следующей последовательности без предварительного промывания планшета:

4.1 80мкл раствора для разведения (R6) в каждую лунку.

*Примечание: Правильность и точность внесения фиолетового раствора для разведения образцов можно оценить спектрофотометрически, при длине волны 620 нм (см. Часть 12 настоящего руководства)*

4.2 20мкл отрицательного контроля (R3) в A1, B1.

20мкл положительного контроля (R4) в C1, D1, E1.

20мкл первого исследуемого образца в F1, если эта лунка не используется как контрольная для мониторинга правильности и точности внесения образцов.

20мкл второго исследуемого образца в G1 и т.д.

Тщательно перемешайте реакционную смесь с помощью 20 мкл пипетки (минимум 3 раза)

Также возможно внесение 100мкл предварительно разведенного (1:5) образца.

Если внесение образцов на планшет занимает более 10 минут, то рекомендуется вносить отрицательные и положительные контроли после тестируемых образцов.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** После внесения образцов цвет раствора в лунках изменится с фиолетового на темно-синий. Наличие образца в лунках можно проконтролировать с помощью спектрофотометрии при длине волны 620 нм (см. Часть 12 настоящего руководства).

5. Закройте лунки самоклеющейся пленкой.

6. Инкубируйте микропланшет в водяном термостате или инкубаторе в течение 60±5 минут:

- процедура 1 - при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,
- процедура 2 - при  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

7. Снимите самоклеющуюся пленку и удалите содержимое лунок в контейнер для загрязнированных отходов, содержащий гипохлорид натрия. Добавьте в каждую лунку 0.370 мл промывающего раствора. Снова удалите содержимое лунок. Еще дважды повторите процедуру промывания (всего 3 промывки). Остаточный объем должен быть меньше 10 мкл. При необходимости переверните планшет вверх дном и выбейте остатки жидкости о фильтровальную бумагу. При использовании автоматического промывателя осуществите промывку по той же схеме.

8. Внесите по 100 мкл конъюгата во все лунки. Перед использованием конъюгат необходимо тщательно, но осторожно перемешать. Закройте планшет новой самоклеющейся пленкой и инкубируйте  $30 \pm 5$  мин:

-процедура 1 - при  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,

-процедура 2 - при  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Конъюгат окрашен в зеленый цвет. Установить наличие в лунке конъюгата 1 возможно спектрофотометрией на длине волны 620 нм (см. Часть 12 настоящего руководства)

9. Удалите самоклеющуюся пленку, удалите содержимое всех лунок и промойте лунки 4 раза как описано выше. Затем подсушите микропланшет, положив его вверх дном на фильтровальную бумагу.

10. Приготовьте субстратный раствор (см. гл.8, реагенты R8+R9).

11. Избегайте попадания прямого света, быстро внесите во все лунки по 100 мкл свежеприготовленного хромогенного раствора (R8+R9), поместите планшет в темное место. Реакция должна протекать в темноте  $30 \pm 5$  минут при комнатной температуре ( $18-30^\circ\text{C}$ ). Не используйте самоклеющуюся пленку во время этой инкубации.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** На данной стадии исследования внесение окрашенного в розовый цвет субстратного раствора может контролироваться визуально. Пустые и заполненные розовым раствором субстрата лунки имеют отчетливо различающиеся цвета. (см. Часть 12 настоящего руководства)

12. Добавьте 100 мкл стоп-раствора (R10), используя ту же последовательность внесения реагента как и для субстратного раствора.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** На данной стадии исследования внесение неокрашенного стоп-раствора может контролироваться визуально. После внесения стоп-раствора розовая окраска субстрата исчезает (в случае отрицательного результата) или изменяется с синей на желтую (в случае положительного результата)

13. Тщательно протрите дно лунок микропланшета. Измерьте на ридере оптическую плотность при 450/620 - 700 нм. Измерения должны проводиться не менее через 4 минуты после добавления стоп-раствора и в течение не более 30 минут после остановки реакции (перед чтением микропланшет должен храниться вне попадания прямых лучей света).

14. Проверьте соответствие вашего плана внесения реагентов и образцов с результатами.

## 10 – НАСТРОЙКА ОБОРУДОВАНИЯ

**ВНИМАНИЕ!** Для обеспечения максимальной достоверности теста тщательно соблюдайте описанный протокол процедуры промывки.

Для вошеров PW40 и PW41 производства Био-Рад (бывш. Санофи Диагностикс Пастер) необходимо использовать следующие препрограммированные режимы:

Промывка 1: T01 N3 Ю00ul

Промывка 2: T01 N4 Ю00ul

## 11 - РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие или отсутствие антител против HCV определяется путем сравнения оптической плотности в исследуемых образцах с величиной контрольного уровня (Ku/cut-off).

1) Расчет среднего значения оптической плотности положительного контроля:

**OPR4**

Пример: Положительный контроль R4

| Лунки | Оптическая плотность |
|-------|----------------------|
| C1    | 1.636                |
| D1    | 1.704                |
| E1    | 1.650                |
| ОБЩАЯ | 4.990                |

$ОПР4 = \text{Общая ОП} / 3 = 4.990 / 3 = 1.663$

2) Расчет контрольного уровня (KY/cut-off)

$KY/cut-off = (ОПР4) / 5$

Пример:  $ОПР4 = 1.663$

$KY/cut-off = 1.663 / 5 = 0.332$

Достоверность анализа:

а) Для отрицательного контроля: оптическая плотность каждой лунки отрицательного контроля должны быть меньше 0.150.

б) Для положительного контроля:

- Средняя величина оптической плотности должна быть больше или равна 1.000 и меньше или равной 2.400, (т.е. 1.0-2.4).
- Если одно из значений оптической плотности позитивного контроля отличается от среднего значения более, чем на 30%, исключите это значение из расчетов и вновь рассчитайте среднее значение по двум оставшимся.
- Если ОП отрицательных контролей или более, чем одного положительного контроля не укладываются в указанные границы, анализ должен быть выполнен повторно.

Интерпретация результатов:

Образцы со значением оптической плотности меньше, чем величина контрольного уровня (KY/cut-off), рассматриваются в тесте МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС версии 2 как отрицательные.

Результаты ниже контрольного уровня на 10% ( $KY/cut-off - 10\% < ОП \text{ Обр} < KY/cut-off$ ) должны быть интерпретированы с особым вниманием и соответствующие образцы рекомендуется перепроверить в дублях.

Образцы с оптической плотностью равной или больше контрольного уровня рассматриваются как первично положительные и должны быть тестированы повторно в дубле для окончательной интерпретации.

Если после повторного тестирования оба результата имеют оптическую плотность равную или выше контрольного уровня, образцы рассматриваются как положительные. Если после повторного тестирования оба результата имеют оптическую плотность ниже контрольного уровня, т.е. первичные результаты не воспроизводятся, образцы рассматриваются как отрицательные.

## 12 – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ РАЗНЕСЕНИЯ РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ.

Метод 1: без использования контрольного реагента.

Присутствие образца в лунке верифицируется путем автоматического измерения оптической плотности при длине волны 620 нм: сравнение оптической плотности после разнесения раствора для разведения образцов (R6) и после разнесения образцов.

Измерение после разнесения раствора для разведения образцов (R6):

Оптическая плотность лунок содержащих R6 должна быть выше 0.2.

Измерение после разнесения образцов или контролей:

Изменение оптической плотности лунок, содержащих R6, после добавления образцов, должно быть больше чем 0.2. (изменение оптической плотности меньше чем на 0.2 указывает на ошибку внесения образца).  $\text{Изменение ОП} = ОП (R6 + \text{образец}) - ОП (R6)$ .

Метод 2: использование контрольного реагента.

Присутствие образца в лунке верифицируется путём автоматического измерения оптической плотности при длине волны 620 нм с использованием контрольной лунки, содержащей только раствор для разведения образцов (R6).

- Оптическая плотность лунки содержащей R6 должна быть выше 0.2.
- Изменение оптической плотности лунок, содержащих R6 и образцы, по сравнению с контрольной лункой, должно быть больше чем 0.2. (изменение оптической плотности меньше чем на 0.2 указывает на ошибку внесения образца). Изменение  $ОП = ОП (R6 + образец) - ОП (R6 \text{ в контрольной лунке})$ .

#### **СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ПРИСУТСТВИЯ КОНЬЮГАТА.**

Конъюгат имеет зелёный цвет.

Присутствие конъюгата в лунке может быть проконтролировано путём измерения оптической плотности при длине волны 620 нм:

- Величина оптической плотности каждой лунки должна быть выше, чем 0.3 (оптическая плотность меньше чем 0.3 указывает на ошибку во внесении конъюгата)

#### **СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ПРИСУТСТВИЯ СУБСТРАТНОГО РАСТВОРА**

Верификация наличия в лунке ферментативного рабочего раствора розового цвета производится автоматическим считыванием показаний на волне 490 нм. Оптическая плотность лунки с внесенным ферментативным рабочим раствором должна превышать 0,100 (меньшая плотность свидетельствует о неудовлетворительном распределении ферментативного раствора).

После внесения раствора субстрата и хромогена, бесцветная лунка явно приобретает розовый цвет.

#### **13 - ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**

Изменения в наборе МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС версии 2 по сравнению с МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС ограничиваются только субстратным раствором (R8 + R9) и стоп-раствором (R10).

Исследования чувствительности и специфичности тест-системы МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС версии 2 подтверждают полученные ранее характеристики теста МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС, приведенные здесь.

Характеристики данного теста были получены на основе анализа следующих типов образцов:

- образцы сывороток доноров крови, отобранных случайным образом;
- образцы сывороток, взятых от пациентов инфицированных вирусом гепатита С;
- сыворотки пациентов с различными диагнозами, не связанными с вирусом гепатита С.

Чувствительность теста МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС проверялась на 532 документированных образцах на, из которых 191 образец сывороток, полученных от хронических носителей вируса гепатита С (факт инфицирования вирусом гепатита С устанавливался по присутствию антител к ВГС методом иммуноблота или определяли РНК вируса при помощи метода полимеразной цепной реакции).

Чувствительность теста МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС в этой работе составила 100%.

Чувствительность теста МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС также исследовалась на сероконверсионных образцах от 55 пациентов. По сравнению с тест-системой МОНОЛИЗА® анти-ВГС Новые антигены МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС в 6 случаях определяла раньше.

Специфичность теста при исследовании 5450 образцов сывороток доноров крови, отобранных случайным образом, составила 99,8%.

Анализ 264 сывороток пациентов с различными патологиями, не связанными с вирусом гепатита С, показал отсутствие неспецифической реактивности данного теста. Тестировались образцы с генотипом 1 – 5 вируса. МОНОЛИЗА® анти-ВГС ПЛЮС версии 2 выявила предварительно генотипированные образцы как реактивные.

Исследование воспроизводимости результатов проводили на 4 образцах: 1 отрицательный образец (образец 1) без анти-ВГС антител, 2 слабоположительных образца (образец 2 и образец 3) и 1 сильно положительный образец с анти-ВГС антителами. Воспроизводимость в одной постановке оценивали по результатам

тестирования этих 4-х образцов в 30 повторах в одной постановке. Межсерийную воспроизводимость исследовали по следующей схеме: в течение 5 дней тестировали 4 образца в 3-х повторах на 2 микропланшетах в 2-х независимых постановках. Результаты исследования воспроизводимости представлены в таблицах:

**Таблица 1: Воспроизводимость в одной постановке**

| n=30             | образец 1 | образец 2 | образец 3 | образец 4 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ОП средн.        | 0,056     | 1,168     | 1,170     | 1,773     |
| К-т реактивности | 0,13      | 2,86      | 2,75      | 4,27      |
| ОП ср./ОП кр.    |           |           |           |           |
| CV (%)           | 13,39     | 6,54      | 7,27      | 4,69      |

**Таблица 2: Воспроизводимость между постановками**

| n=30             | образец 1 | образец 2 | образец 3 | образец 4 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ОП средн.        | 0,085     | 1,164     | 1,200     | 1,727     |
| К-т реактивности | 0,22      | 2,93      | 3,02      | 4,34      |
| ОП ср./ОП кр.    |           |           |           |           |
| CV (%)           | 12        | 6,51      | 4,04      | 5,50      |

#### 14 – ОГРАНИЧЕНИЕ ТЕСТА

Учитывая разнообразие иммунологических реакций больных, инфицированных вирусом гепатита С, особенно во время сероконверсии, могут наблюдаться некоторые различия в обнаружении между тестами. Разница результатов обусловлена различиями в используемых антигенных белках. Отрицательный результат при скрининге не исключает возможность наличия начального периода вирусного гепатита С.

Колориметрический метод оценки осаждения проб, конъюгата и рабочего ферментативного раствора не позволяет судить о воспроизводимости дозирования объемов реагентов. Он позволяет произвести лишь качественную оценку наличия в лунках пробы, конъюгата, субстратного раствора. Уровень ошибочных заключений в значительной степени зависит от точности используемой системы (кумулятивный коэффициент вариации распределения реагентов и регистрации ОП, превышающий 10 % существенно понижает качество верификации).

#### 15 - ЛИТЕРАТУРА - см. французскую версию.