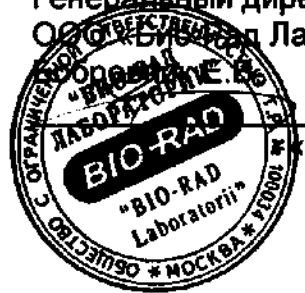


8

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «Биорад Лаборатории»
_____ / _____ 2008 г.



**Инструкция к применению изделия
медицинского назначения: Тест-системы для диагностики «in vitro»
гепатита В комплектов «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» на 96 тестов и на
480 тестов**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Монолиза AgHBs УЛЬТРА» является одноэтапным иммуноферментным анализом в «сэндвич» формате для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) в сыворотке или плазме крови человека.

2. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Выявление антигена HBs в сыворотке указывает на инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В. HBs антиген – это первый маркер, который появляется и может быть обнаружен за 2-3 недели до появления клинических симптомов заболевания. Период его выявления может быть как очень коротким (несколько дней), так и очень длинным (несколько лет). Циркуляция HBs антигена в крови более 6 месяцев свидетельствует о «хроническом гепатите». Ввиду широкого распространения бессимптомного хронического носительства риск передачи гепатита В при переливании крови имеет большое значение в трансфузиологии, предупреждение передачи вируса основано на выявлении HBs антигена при каждой кроводаче.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА МОНОЛИЗА® HBs Ag УЛЬТРА

«Монолиза AgHBs УЛЬТРА» – это одноэтапный ИФА, основанный на принципе «сэндвича», в котором используют моноклональные и поликлональные антитела, подобранные по их способности связывать различные субтипы HBs антигена,

которые определены ВОЗ и характеризуют большинство различных штаммов вируса гепатита В.

Иммуносорбент «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» представляет собой разборный планшет, для сорбции используются мышинные моноклональные антитела.

Конъюгат в составе комплекта «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» представляет собой смесь мышинных моноклональных антител и козьих поликлональных антител против HBs антигена. Эти антитела связаны с пероксидазой.

Методика состоит из следующих этапов:

1. Внесение контрольных и исследуемых образцов в лунки планшета. Процесс внесения образцов может контролироваться визуально по изменению окраски: существует явное цветовое различие между пустыми и заполненными лунками. Можно осуществлять автоматический контроль, регистрируя оптическую плотность при 490/620-700 нм.
2. Добавление раствора конъюгата, окрашенного в красный цвет, в лунки микропланшета.
Добавление раствора конъюгата также может быть проконтролировано визуально: после добавления раствора конъюгата в лунки планшета цвет содержимого лунки становится красным. Можно осуществлять автоматический контроль внесения конъюгата при регистрации оптической плотности на 2-х длинах волн 490/620-700 нм. Правильность внесения образцов также может контролироваться на этом этапе автоматически при регистрации оптической плотности на 2-х длинах волн 490/620-700 нм.
3. Инкубация при 37 °С в течение 1,5 часов. Удаление не связавшегося конъюгата в процессе отмывки.
4. Добавление субстратного раствора для ферментативной реакции.
Добавление субстрата можно контролировать визуально или автоматически: явное отличие цвета пустых лунок от лунок с розовым раствором субстрата. Автоматический контроль может осуществляться при регистрации оптической плотности на 490 нм.
5. Инкубация в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре (18-30°С). Наличие в лунке связанного конъюгата отражается в изменении окраски.
6. Добавление стоп-реагента.

Добавление стоп-реагента можно контролировать визуально. Раствор субстрата, который имеет изначально розовый цвет, становится бесцветным при отсутствии реакции. Лунки с положительными образцами окрашиваются в голубой цвет, который переходит в желтый.

7. Измерение оптической плотности при 450/620-700 нм и интерпретация результатов.

4. СОСТАВ КОМПЛЕКТА МОНОЛИЗА AgHBs УЛЬТРА

Все реагенты могут быть использованы только для диагностики in vitro

Метка	Реагент	Форма выпуска	
		96 тестов	480 тестов
R1	Иммуносорбент: разборный планшет, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок, фиксированных в рамке. Для сорбции планшета использованы мышинные моноклональные антитела к поверхностному белку ВГВ	1 планшет	5 планшетов
R2	Промывочный раствор (20х): Концентрат (20х), Трис-NaCl буфер, pH=7,4 Консервант: ProClin™ 300 (0.04%)	1 флакон 70 мл	1 флакон 235 мл
R3	Отрицательный контрольный образец: Раствор БСА в Трис-HCl буфере Консервант: ProClin™ 300 (0.1%).	2 флакона 2x2,5мл	2 флакона 2x2,5мл
R4	Положительный контрольный образец: Смесь субтипов ad и ay HBs антигена с БСА в Трис-HCl буфере. Инактивирован. Консервант: ProClin™ 300 (0.1%).	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл
R6	Раствор для разведения конъюгата: Трис-HCl буфер (pH 7.4), содержащий БСА, Твин 20, бычьи и мышинные иммуноглобулины с добавлением индикатора. Консерванты: ProClin™ 300 (0.1%), Ципрофлоксацин (10 мкг/мл).	1 флакон 8 мл	2 флакона 2 x 18 мл
R7	Конъюгат (лиофилизированный): Смесь моноклональных (мышиные) и поликлональных (козьи) анти-HBs антител, связанных с пероксидазой	1 флакон sqf 8 мл	2 флакона sqf 2 x 18 мл
R8	Субстратный раствор:	1 флакон	2 флакона

	Буферный раствор цитрата и ацетата натрия (pH 4.0), содержащий 0,015% H ₂ O ₂ и DMSO (4%)	60 мл	2 x 60 мл
R9	Хромоген (розового цвета) Раствор, содержащий тетра-метилбензидин (ТМБ)	1 флакон 5 мл	2 флакона 2 x 5 мл
R10	Стоп-реагент Раствор серной кислоты 1N	1 флакон 28 мл	3 флакона 3 x 28 мл
	Клейкая пленка	4 шт.	12 шт.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

«Монолиза AgHBs УЛЬТРА» : Специфический ID номер = 51.

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

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 использованием все реагенты необходимо выдержать при комнатной температуры в течение 30 минут, а промывочный раствор (R2) в рабочей концентрации в течение 1 часа.
- 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. Приготовленный 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.

6. 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.
- Положительный контрольный образец (R4), содержащий ad и ay субтипы очищенного HBs антигена, приготовлен из плазмы крови человека, которая была исследована, и в ней не было обнаружено поверхностного антигена гепатита В (HBs АГ), антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антител к вирусу гепатита С. Контрольный образец инаktivирован прогреванием.
- 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 деkontаминации:
 - 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.
- Химикаты 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 раздражающее вещество ProClin™ 300 (0,04 %; 0,1 % и/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.

7. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- Дистиллированная вода.
- Гипохлорит натрия (дезинфектант) и бикарбонат натрия.

- Автоматические или полуавтоматические пипетки-дозаторы с фиксированным или регулируемым объемом для раскапывания жидкостей объемом 50 мкл, 100 мкл и 1000 мкл, а также 10 мл.
- Мерные цилиндры объемом 100 мл; 1000 мл.
- Контейнер для биологически опасных отходов.
- Водяная баня или инкубатор для микропланшет с температурным режимом $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (*).
- Ручной, полуавтоматической или автоматический промыватель микропланшет (*).
- Фотометр для планшет со светофильтрами 450, 490 нм и 620 – 700 нм (*).
- Фильтровальная бумага.

(*) Более детальную информацию по оборудованию, рекомендованному службой технической поддержки, можно получить в представительстве компании.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: перед использованием реагенты должны иметь комнатную температуру ($18-30^{\circ}\text{C}$).

1) Реагенты, готовые к применению

Реагент 1 (R1): Планшет - иммуносорбент

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 $+2 - 8^{\circ}\text{C}$.

Реагент 3 (R3): отрицательный контрольный образец

Реагент 4 (R4): положительный контрольный образец

Реагент 10 (R10): стоп-реагент

2) Подготовка рабочих растворов реагентов

Промывочный раствор (концентрат x20): Реагент 2 (R2):

Разведите концентрат в дистиллированной воде в соотношении 1:20, чтобы получить готовый к употреблению промывочный раствор. На один планшет из 12 стрипов достаточно 800 мл раствора.

Рабочий раствор конъюгата: реагент 6 + реагент 7 (R6+R7)

Аккуратно обстучите флакон с лиофилизированным конъюгатом (R7) о рабочую поверхность, чтобы устранить остатки вещества с резинового колпачка флакона. Осторожно выньте резиновую пробку и вылейте содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (R6) во флакон с лиофилизированным конъюгатом (R7). Закройте крышку и оставьте флакон на 10 минут, время от времени переворачивая и слегка встряхивая его для ускорения растворения.

Раствор для ферментативной реакции: реагент 8 + реагент 9 (R8+R9):

Разбавьте реагент R9 (хромоген) в реагенте R8 (субстратный раствор) в соотношении 1:11 (например: 1 мл R9 в 10 мл реагента R8). Рабочий раствор для ферментативных реакций после приготовления стабилен в течение 6 часов при хранении в темноте.

9. УСЛОВИЯ И СРОК ХРАНЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ 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 (за исключением указанных реагентов).

R1: После вскрытия вакуумной упаковки стрипы могут использоваться в течение 1-го месяца при хранении в аккуратно запечатанном пакете +2 - 8 °C.

R2: Разведенный промывочный раствор может использоваться в течение 2-х недель при хранении при +2 – 30 °C. Концентрат промывочного раствора может храниться при +2 – 30 °C до окончания срока годности.

R6 + R7: после приготовления реагент, хранящийся при +2 – 8 °C, можно использовать в течение 1 месяца после приготовления. При хранении при комнатной температуре (18 – 30 °C) можно использовать в течение 8 часов.

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

10. СБОР ОБРАЗЦОВ И ПРОБОПОДГОТОВКА

Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранной 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 центрифугировать перед проведением анализа. Присутствующие в образце частицы фибрина или сгустки могут давать ложноположительные результаты. Образцы должны храниться при $+2^{\circ}\text{C}$ - $+8^{\circ}\text{C}$, если исследование будет выполняться не позднее 7 дней с момента взятия образца. При длительном хранении (до нескольких месяцев) пробу следует хранить при температуре -20°C .

Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Образцы нельзя исследовать после 3-х таких циклов. Если необходимо транспортировать образцы, их следует упаковать в соответствии с действующими правилами транспортировки этиологических агентов.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ЗАГРЯЗНЕННУЮ, ГЕМОЛИЗИРОВАННУЮ СЫВОРОТКУ ИЛИ ПЛАЗМУ, А ТАКЖЕ МАТЕРИАЛ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ!

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: Образцы, содержащие альбумин до 90 г/л, билирубин 100 мг/л, липемические образцы, содержащие до 36 г/л эквивалента триглицеридов, и гемолизированные пробы, содержащие гемоглобин до 1 г/л могут быть исследованы с достоверным результатом.

11. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Строго следуйте предложенной процедуре анализа.

Для оценки правильности выполнения теста и результатов анализа используйте отрицательный (R3) и положительный (R4) контрольные образцы в каждой постановке теста.

Необходимо соблюдать принципы лабораторной диагностики (Good Laboratory Practice):

- 1) Тщательно подготовьте идентификацию проб и их распределение на планшете.
- 2) Приготовьте необходимое количество рабочего промывочного раствора (см. пункт 8).
- 3) Приготовьте рабочий раствор конъюгата R6+R7 (см. пункт 8).
- 4) Извлеките из упаковочного пакета необходимое количество стрипов (R1), установите их в рамку планшета, оставшиеся стрипы аккуратно упакуйте обратно в защитный пакет.

- 5) Внести реагенты в лунки в следующей последовательности (согласно плану распределения образцов на планшете):

Лунки A1, B1, C1 и D1: 100 мкл отрицательного контроля (R3),

Лунка E1: 100 мкл положительного контроля (R4),

Лунка F1: 100 мкл первого исследуемого образца, если эта лунка не используется для контроля правильности внесения образцов и конъюгата (в этом случае ее оставляют пустой для определения цветовых различий между пустой и заполненной лункой)

Лунки G1, H1...и т.д. : 100 мкл исследуемого образца.

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

ВНИМАНИЕ: Внесение проб можно контролировать визуально: существуют цветовые различия между пустыми и заполненными лунками (см. пункт 14)

- 6) Быстро внести 50 мкл рабочего раствора конъюгата (R6+R7) во все лунки. Флакон с рабочим раствором конъюгата перед использованием следует взболтать. Раствор в каждой лунке планшета следует гомогенизировать.

ВНИМАНИЕ: Процесс внесения конъюгата, окрашенного красным цветом, можно контролировать визуально (цветовое различие можно контролировать автоматически, см. пункт 14).

- 7) Герметизируйте стрипы планшета клейкой пленкой и инкубируйте в течение 1 часа и 30 ± 5 минут при 37 ± 1 °C.

- 8) Удалите клейкую пленку. Тщательно удалите содержимое лунок в контейнер для контаминированных отходов, промойте лунки планшета не менее 5 раз. Остаточный объем жидкости в лунках после завершения процедуры не должен превышать 10 мкл (при необходимости, просушите стрипы на фильтровальной бумаге).

- 9) Приготовьте раствор для ферментативной реакции (R8+R9), быстро внесите в каждую лунку по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора (R8+R9). Инкубируйте в темноте при комнатной температуре (18-30 °C) в течение 30 ± 5 минут. Во время данной процедуры не используйте клейкую пленку.

ВНИМАНИЕ: Процесс внесения раствора для ферментативной реакции конъюгата, окрашенного розовым цветом, можно контролировать визуально (цветовое различие можно контролировать автоматически, см. пункт 14).

10) Добавьте 100 мкл стоп-реагента (R10) в каждую лунку, используя ту же самую последовательность и скорость раскапывания, что и для субстратного раствора. Гомогенизируйте содержимое лунок планшета.

***ВНИМАНИЕ:** Процесс внесения стоп-реагента можно контролировать визуально: раствор субстрата, который имеет изначально розовый цвет становится бесцветным при отсутствии реакции или переходит из голубого цвета в желтый в лунках с положительными образцами.*

11) 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.

12) Проверьте соответствие между спектрофотометрическими и визуальными данными, а также между распределением проб в планшете и идентификационным протоколом.

12. АДАПТАЦИЯ ПРОТОКОЛА ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕСТА

Промывка: 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.

По вопросам адаптации протокола выполнения теста следует обращаться в представительство компании БИО-РАД.

13. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1) Расчет среднего значения оптической плотности отрицательного контроля:

ОП R3

Пример:

Отрицательный контроль R3	ОП
A1	0.030
B1	0.031
C1	0.032

D1

0.027

Сумма значений ОП R3=0.120

(ОП R3)ср. = Сумма значений ОП R3/4 = 0.120/4=0.030

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

Критическое значение ОП равно: (ОП R3)ср. + 0,050

Пример: (ОП R3)ср. = 0.030

ОП крит. = 0.030 + 0.050 = 0.080

3) Достоверность анализа

Все отдельные величины оптической плотности отрицательного контроля должны быть меньше или равны 0,080 ед. ОП.

Значение оптической плотности положительного контроля (ОП R4) должно быть больше или равно 1,000 ед. ОП.

Если одно из значений оптической плотности отрицательных контрольных образцов не соответствует этому условию или оно отличается от среднего значения (ОП R3)ср. более чем на 40%, то это значение можно исключить и пересчитать среднее значение оптической плотности отрицательного контроля по трем оставшимся. При вычислении можно исключить значение ОП только одного отрицательного контрольного образца.

В случае, если значения ОП отрицательных контрольных образцов очень низкие (среднее значение оптической плотности отрицательного контроля (ОП R3)ср. меньше 0,010 ед. ОП), использовать критерии исключения отдельных значений отрицательного контроля нельзя.

Тест необходимо переделать, если все контрольные значения выходят за пределы указанных норм.

4) Расчет коэффициента реактивности

Для каждого образца рассчитывается коэффициент реактивности (КР) как отношение:

$$\text{КР} = \text{ОП образца} / \text{Значение (ОП Крит.)}$$

5) Интерпретация результатов.

Образцы с коэффициентом реактивности ниже 1 оцениваются как отрицательные в тесте «Монолиза AgHBs УЛЬТРА». Однако, результаты образцов, чья оптическая плотность близка по значению к критической (коэффициент реактивности между 0,9 – 1,00), должны интерпретироваться с осторожностью. До окончательной интерпретации должно быть проведено повторное исследование указанных образцов в парных пробах.

Образцы с коэффициентом реактивности большим или равным 1 оцениваются как первично положительные в тесте «Монолиза AgHBs УЛЬТРА». До окончательной интерпретации должно быть проведено повторное исследование указанных образцов в парных пробах.

Если при повторном исследовании обе пробы показали значение коэффициента реактивности меньше 1, этот образец оценивается как отрицательный в тесте «Монолиза AgHBs УЛЬТРА».

Для первично реактивных образцов или образцов с неопределенным результатом ($0,9 < КР < 1,0$), если в результате повторного исследования хотя бы одна проба из двух парных проб продемонстрировала коэффициент реактивности больше или равный 1, то результат, полученный при первичном тестировании, считается воспроизводимым, и данный образец оценивается как положительный в «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» с учетом ограничений теста, описанных ниже.

В случае, если образец исследовался дважды и, при повторном исследовании, продемонстрировал отрицательный результат в «Монолиза AgHBs УЛЬТРА», но при этом одно из значений ОП оказалось близко к критическому значению ОП (коэффициент реактивности между 0,9 и 1), полученный результат следует интерпретировать осторожно. Необходимо продолжить анализ, используя другой образец, взятый у этого пациента или другой метод исследования.

В случае, когда значение оптической плотности исследуемого образца оказалось очень низким (отрицательная ОП), при этом контроль внесения пробы и реагентов не выявил никаких ошибок, этот результат можно интерпретировать как отрицательный.

Для подтверждения каждого положительного результата, полученного в «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» его необходимо исследовать методом нейтрализации HBs Ag в подтверждающем тесте.

Причины несовпадения результатов первичных и повторных исследований:

- Неадекватная промывка микропланшета,
- Загрязнение отрицательных образцов (сыворотка, плазма) образцами с высокими концентрациями HBs Ag
- Загрязнение раствора для ферментативной реакции веществами-окислителями (ионы металлов, гипохлорит натрия и т.д.)
- Загрязнение стоп-реагента

14. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ПРОБ И КОНЬЮГАТА

1) Верификация дозирования проб.

Существует возможность определить присутствие образцов в лунках планшета автоматически на стадии, предшествующей добавлению раствора конъюгата. При определении ОП на двух длинах волн 490/620-700нм лунка, содержащая образец, имеет значение ОП в пределах 0,050-0,900 ед. ОП.

Имеется явное отличие в окраске между пустой лункой и лункой, содержащей образец, содержимое которой окрашено в бледно-желтый цвет.

2) Верификация дозирования конъюгата.

Когда присутствие образца в лунке планшета верифицировано фотометрически, как описано выше, при определении ОП на 490/620-700 нм, после добавления конъюгата оптическая плотность реакционной среды меняется, при определении ОП на 490/620-700 нм, в лунках содержащих конъюгат и образец ОП более 1,100.

После добавления конъюгата цвет содержимого лунки с образцом меняется от бледно-желтого до красного.

3) Верификация совместного присутствия образца и конъюгата в лунке планшета (только спектрофотометрический метод).

Если процедура автоматической верификации внесения образцов (см. выше) не проводилась, то при автоматической регистрации ОП содержимого лунок на 490/620-700нм можно проконтролировать одновременное присутствие образца и

конъюгата. Совместное присутствие в лунке образца и конъюгата по сравнению с лункой, содержащей только конъюгат, увеличивает оптическую плотность содержимого на не менее, чем 0,35 ед. ОП.

$$[\text{ОП (образец+конъюгат)} - \text{ОП (только конъюгат)}] \geq 0,35$$

Верификация внесения раствора для ферментативной реакции

Существует возможность автоматически контролировать присутствие раствора для ферментативной реакции в лунках планшета при определении ОП на длине волны 490 нм : лунка содержащая раствор для ферментативной реакции должна иметь ОП больше, чем 0,100 ед. ОП (низкое значение ОП указывает на ошибку при внесении раствора для ферментативной реакции).

15. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Характеристики «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» были получены при исследовании образцов крови доноров, отобранных случайным образом, а также пациентов с острым и хроническим гепатитом В или с заболеваниями, не связанными с гепатитом В, а так же при исследовании коммерческих образцов и сероконверсионных панелей.

Более точное определение предела аналитической чувствительности было получено при исследовании французской панели сывороток SFTS и стандартов ВОЗ.

Специфичность

Параметры специфичности определялись при исследовании 9894 образцов крови доноров, отобранных случайным образом в трех различных регионах. Установлена специфичность 99.94% (9887/9893).

При повторном анализе одного из первично реактивных образцов положительный результат на HBs антиген подтвердился.

Исследования специфичности проводились в клинической лаборатории гепатологического центра. Из 200 исследованных клинических образцов было получено 2 результата, потребовавших повторного анализа. В результате повторного исследования было обнаружено следующее: один из образцов, продемонстрировавших при первичном исследовании неопределенный результат (коэффициент реактивности = 0,97), определился при повторном анализе как положительный (коэффициент реактивности = 1,87); для другого образца результат

первичного обследования подтвердился (коэффициенты реактивности – 2,29 и 1,99 для первичного и повторного исследования соответственно).

С помощью комплекта «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» были проанализированы 289 образцов от пациентов с различным статусом или заболеваниями, не связанными с вирусом гепатита В (образцы беременных женщин, образцы, содержащие ревматоидный фактор, ауто- антинуклеарные антитела, добавленные антитела против мышинных Ig, образцы, содержащие маркеры других вирусных или бактериальных инфекций). Выли выявлены 11 образцов с положительным результатом тестирования. Эти образцы исследовались так же при помощи других коммерческих ИФА наборов с применением реакции нейтрализации. 10 из 11 повторно реактивных образцов в тесте «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» являлись положительными при анализе с помощью других коммерческих наборов для определения антигена HBs. Один образец в нейтрализационном тесте показал неопределенный результат и его результат был исключен из дальнейших расчетов. 2 образца в тесте с нейтрализацией показали отрицательный результат (один образец содержал антитела IgG против белков ВПГ, второй образец, продемонстрировавший положительный результат во всех коммерческих ИФА наборах, был получен от пациента с миеломой). Расчетная специфичность составила 99,28% (276/278). Для 9 других образцов, положительных по IgG ВПГ или маркерам миеломы, в тест-системе «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» был получен отрицательный результат.

Аналитическая чувствительность

Нижний предел чувствительности набора, установленный при исследовании национального французского стандарта панели HBs антигена SFTS 2001 - 0,060 нг/мл, при исследовании стандарта ВОЗ – 0,050 МЕ/мл.

С помощью комплекта «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» образцы из панели SFTS 2001, содержащие следующие субтипы вируса гепатита «В»: adw2, adw4, adr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayw5 и aug, были определены как положительные с коэффициентом реактивности более 5,0.

Чувствительность

Исследование чувствительности теста было выполнено на 428 положительных образцах от больных с острым и хроническим вирусным гепатитом В. Чувствительность набора 100%.

С использованием теста «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» было проведено исследование панели сывороток, которые содержали 15 рекомбинантных белков, имитирующих наиболее часто встречающиеся изменения аминокислотного состава антигена HBs. Все сыворотки были определены как положительные.

Выполнено сравнительное исследование с другими коммерческими наборами на 60 зарегистрированных сероконверсионных панелях (293 образца). Результаты полученные на 29 панелях при использовании «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» и «Монолиза® AgHBs ПЛЮС» совпадали. Была показана большая чувствительность теста «Монолиза AgHBs УЛЬТРА», по сравнению с «Монолиза® AgHBs ПЛЮС», которая проявлялась в более раннем выявлении маркеров инфекции (в 28 панелях по одному образцу, в 2 панелях по два образца и в одной панели - 5 образцов).

Воспроизводимость

Для исследования воспроизводимости результатов «Монолиза AgHBs УЛЬТРА» были использованы 4 образца: 1 отрицательный образец, 2 положительных образца (образец 2 и 3) и 1 образец с высоким содержанием HBs Ag.

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 в дублях в течение 20 дней в двух независимых сериях исследований ежедневно. Результаты представлены в следующих таблицах:

Табл. 1: Воспроизводимость результатов в одном исследовании

N = 30	Образец №1	Образец №2	Образец №3	Образец №4
Среднее значение коэффициента реактивности	0,38	3,17	8,92	14,63
Стандартное отклонение (SD)	0,04	0,12	0,34	0,91
Среднее квадратичное отклонение CV (%)	10,59	3,83	3,77	6,19

Табл. 2: Воспроизводимость результатов в 40 сериях исследований

N = 40	Образец №1	Образец №2	Образец №3	Образец №4
Среднее значение коэффициента реактивности	0,48	3,06	8,02	13,85
Стандартное отклонение (SD)	0,087	0,251	0,751	1,471
Среднее квадратичное отклонение CV (%)	18,1	8,2	9,36	10,63

16. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Отрицательный результат указывает на то, что исследованный образец не содержит антигена HBs, выявляемого комплектом «Монолиза AgHBs УЛЬТРА». Однако, так как HBs антиген может присутствовать в очень низкой концентрации, которая не может быть выявлена, результат исследования не может служить основанием полного исключения инфицирования вирусом гепатита В.
- В дополнение к вышесказанному, несколько литературных источников сообщают о случаях гепатита В (острого или хронического), при которых выявляется ДНК вируса в отсутствии поверхностного антигена (AgHBs – отрицательные пациенты). Такой исключительно редкий серологический профиль связан либо с мутациями в генетической последовательности, ответственной за синтез S и пре-S протеинов (что затрудняет определение антигена иммунологическими реагентами), либо, как правило, с участками генома X и pol, что индуцирует низкую репродуктивную способность вируса. В этих редких случаях для окончательного диагноза инфекции рекомендуется исследовать дополнительные маркеры ВГВ (анти-HBs антитела или, по возможности вирусную ДНК).
- Для подтверждения положительного результата (в соответствии с критериями интерпретации результата «Монолиза AgHBs УЛЬТРА») образец должен быть исследован методом нейтрализации HBs антигена (например: комплект «Монолиза HBsAg Ультра подтверждающий», кат. № 72408).
- Колориметрический метод контроля раскапывания 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.

17. ЛИТЕРАТУРА

1. COUROUCE A.M., LEE H., DROUET J., CANAVAGGIO M. and SOULIER J.P. (1983) Monoclonal antibodies to HBs Ag : a study of their specificities for eight different HBs subtypes. *Developments in Biological Standardization*, 54, 527-534.
2. COUROUCE A.M., PLANCON A. and SOULIER J.P. (1983) Distribution of HBs Ag subtypes in the world. *Vox Sang.* 44, 197-211.
3. DAVID G.S., PRESENT W., MARTINIS J., WANG R., BATHOLOMEW R., DESMOND W. and SEVIER E.D., (1981) Monoclonal antibodies in the detection of hepatitis infection. *Medical Laboratory Sciences*, 38, 341-348.
4. DROUET J., COUROUCE A.M., KALIL J., LEE H., and FELLOUS M. (1981) Monoclonal antibodies to HBs Ag produced by murine hybridomas. In *viral hepatitis*, edited by Szmunness W. Alter H.J., Maynard J.E. The Franklin Institute Press, 706.
5. FIELDS H.A., DAVID C.L., BRADLEY D.W. and MAYNARD J.E. (1983) Experimental conditions affecting the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) - *Bulletin of the World Health Organization*, 61, 1, 135-142.
6. LEE H.H., COUROUCE A.M., PERE M., CANAVAGGIO M., DROUET J. and SOULIER J.P. (1983) Monoclonal antibodies to HBs Ag; a study of their specificities against HBs Ag subtypes and their utilization in ELISA. *International Association of Biological Standardization. International Symposium on Monoclonal Antibodies : Paris, France.*
7. SOULIER J.P., COUROUCE A.M., LEE H., DROUET J., MULLER A. and CANAVAGGIO M. (1983) Monoclonal antibodies against HBs antigen. *Bulletin Biotest* (vol. 4, 353-358).
8. WANDS J.P., CARLSON R.L., SCHOEMAKER H., ISSELBACHER K.J. and ZURAWSKI V.R. (1981) Immunodiagnosis of hepatitis B with high-affinity IgM monoclonal antibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 78, 2, 1214-1218.
9. M. CANAVAGGIO, A.M. COUROUCE, M. PERE, H. LEE Specificite d'anticorps monoclonaux diriges contre le determinant a de l'Ag HBs (1985). *Nouvelle Revue Francaise d'Immunohematologie (Springer International)*, 27, 2, 134.
10. J. DROUET, G. CHARRIER, A.M. COUROUCE, M. PERE, J.F. DELAGNEAU, J. ROISIN (1985) Nouveaux reactifs de depistage de l'Ag HBs et de dosage de l'anticorps anti-HBs. *Nouvelle Revue Francaise d'Immunohematologie (Springer International)*, 27, 2, 134.

Специально
специально для
(специально)
интернет



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «Био-Рад Лаборатории»

Борозник Е.В.



2008 г.

Инструкция к применению изделия медицинского назначения: Тест-системы для диагностики «in vitro» гепатита В комплект «Монолиза AgHBs УЛЬТРА подтверждающий»

1 – НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ - тест, предназначенный для подтверждения присутствия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) в человеческой сыворотке или плазме, которые были определены в скрининговом тесте МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА (кат. номера 72346 / 72348) как реактивные.

2 – ПРИНЦИП ТЕСТА

МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ тест использует принцип нейтрализации избытком анти-HBs антител (анти-HBs сыворотка - нейтрализующий реагент) антигена HBs содержащегося в образце сыворотки или плазмы. С помощью комплекта МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ рекомендуется исследовать образцы, которые были определены как повторно реактивные в скрининговой тесте МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.

Если образец является положительным по HBs Ag, анти-HBs антитела насыщают антигенные детерминанты образца, которые уже не могут связываться с антителами, фиксированными на твердой фазе. Снижение оптической плотности наблюдается в образцах при сравнении результатов пробы после добавления нейтрализующего реагента с пробой, в которую добавлен отрицательный контроль на разведение, не содержащий анти-HBs антител. Могут быть проанализированы несколько разведений образца, для учета проб с различным содержанием HBs Ag.

Тестирование состоит из следующих этапов:

1) Инкубация контрольных и положительных по HBs Ag образцов с нейтрализующим реагентом и конъюгатом в присутствии анти-HBs антител, фиксированных на твердой фазе.

Для каждого исследуемого образца наличие нейтрализации контролируют с использованием дополнительной лунки, в которую вносят вместо нейтрализующего реагента отрицательную сыворотку – контроль на разведение.

Остальные этапы процедуры тестирования совпадают с протоколом МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.

2) Промывка и выявление ферментативной активности комплекса, связанного с твердой фазой определяется при добавлении субстрата.

3) После остановки ферментативной реакции, проводят измерение оптической плотности на ридере при 450/620-700 нм и интерпретацию результатов.

3 – СОСТАВ НАБОРА

Метка	Реагент	Количество
RA	Нейтрализующий реагент. Tris NaCl буфер, содержащий овечью и человеческую сыворотку отрицательную по HBsAg, анти-ВИЧ 1/2 и анти-ВГС антителам с добавлением анти-HBs антител. Реагент готов к употреблению Консервант: Proclin™ 300 (0,25 %).	1 флакон 0,7 мл
RB	Отрицательный контроль на разведение: Tris NaCl буфер, содержащий овечью и человеческую сыворотку отрицательную по HBsAg, анти-ВИЧ 1/2 и анти-ВГС. Реагент готов к употреблению Консервант: Proclin™ 300 (0,25 %).	1 флакон 0,7 мл
RC	Раствор для разведения образцов 0,85 % солевой физиологический раствор. Реагент готов к употреблению Консервант: Proclin™ 300 (0,1 %).	1 флакон 27 мл

4 – МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте и не используйте в одном и том же исследовании реагенты из разных серий комплекта МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ.
- Перед использованием все реагенты необходимо выдержать при комнатной температуры (18-30°C) в течение 30 минут.
- Используйте стеклянную посуду, предварительно хорошо отмытую и ополоснутую дистиллированной водой, или, что предпочтительно, одноразовую посуду.
- Следуйте инструкции по применению комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.

5 – ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты, включенные в набор, предназначены для использования «in vitro».
- Материал человеческого происхождения, использованный для приготовления нейтрализующего реагента (RA) и отрицательного контроля на разведения RB исследован и не содержит HBs Ag, анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС антитела. Так как ни один из существующих методов не гарантирует абсолютное отсутствие вирусов ВИЧ, гепатита В и С, а также других патологических агентов, обращайтесь с реагентами человеческого

происхождения, также как и с пробами пациентов, как с потенциально инфицированным материалом.

- Общие требования по технике безопасности изложены в инструкции по применению комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.
- Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество ProClin™ 300 (0,04; 0,1 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.

6 – НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Обратитесь к инструкции по применению комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.

7 – СРОК ГОДНОСТИ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

- До начала использования храните набор при +2-8°C
- После вскрытия упаковки все реагенты из набора могут быть использованы в течение всего срока до даты окончания срока годности, указанной на внешней упаковке при хранении в условиях температуры +2-8°C.

8 – ОБРАЗЦЫ

- Следуйте инструкции по применению комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.
- Образцы с очень высокой концентрацией HBs Ag в неразведенном состоянии не могут быть нейтрализованы нейтрализующим агентом. Обратитесь к подразделу «Критерии правильности выполнения теста» в главе 10 «РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ» настоящей инструкции.

9 – МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выполняйте процедуру, следуя инструкции по применению комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.

1. Приготовьте промывающий раствор R2 и рабочий раствор конъюгата (R6 + R7) : следуя подразделу «Подготовка рабочих растворов реагентов» главы 8 «ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ» в инструкции по применению комплект МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.
2. Извлеките из защитного пакета микропланшеты необходимое количество стрипов (реагент R1). Уберите неиспользованные стрипы обратно в пакет, закройте его.
3. Внесите реагенты в лунки микропланшета следующим образом:

- Лунки A1, A2 : 100 мкл отрицательного контрольного образца (R3) из комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.
- Лунки B1, B2 : 100 мкл положительного контрольного образца (R4) из набора МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.
- Лунки C1, C2, D1, D2 : 100 мкл первого образца для подтверждения
- Лунки E1, E2, F1, F2 : 100 мкл второго образца для подтверждения
- Лунки G1, G2, H1, H2: 100 мкл третьего образца для подтверждения

В зависимости от используемой тест-системы порядок внесения контрольных и исследуемых образцов может быть различным.

4. Добавьте по 20 мкл отрицательного контроля на разведение RB в лунки A1, B1, C1, D1, E1, G1, F1, H1,... и по 20 мкл нейтрализующего реагента RA в лунки A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2 и т.д.
5. Добавьте по 50 мкл рабочего раствора конъюгата (R6 + R7) во все лунки. Гомогенизируйте содержимое лунок с помощью микропипетки как минимум 3-мя аспирациями.
6. Выполняйте последующие процедуры, начиная с пункта номер 7 главы 11 «МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА» инструкции по применению комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА.

10 – РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1) Соотношение реактивности (R) контрольных образцов и исследуемых образцов

1. Для положительных контрольных образцов (R4) и отрицательных контрольных образцов (R3) из комплекта МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА вычислите:

$$\text{Соотношение реактивности} = \frac{\text{ОП контроля с RB}}{[(\text{ОП R3 с RB} + \text{ОП R3 с RA})/2] + 0,050}$$

2. Для каждого образца вычислите:

$$\text{Соотношение реактивности} = \frac{\text{Среднее ОП образца с RB}}{[(\text{ОП R3 с RB} + \text{ОП R3 с RA})/2] + 0,050}$$

2) Процент ингибирования

1. Для положительных контрольных образцов (R4) и отрицательных контрольных образцов (R3) с добавлением контроля на разведение (RB) и обработанных нейтрализующим реагентом (RA) рассчитайте процент ингибирования:

$$(\text{ОП контроля с RB}) - (\text{ОП контроля с RA})$$

$$\text{Процент ингибирования} = \frac{\text{---}}{(\text{ОП контроля с RB})} \times 100 \%$$

2. Для каждого исследуемого образца с добавлением контроля на разведение (RB) и обработанного нейтрализующим реагентом (RA) рассчитайте процент ингибирования:

$$\text{Процент ингибирования} = \frac{(\text{ОП среднее с RB}) - (\text{ОП среднее с RA})}{(\text{ОП среднее с RB})} \times 100 \%$$

3) Критерии правильности выполнения теста

1. Значения оптической плотности отрицательного контроля (R3) с добавлением контроля на разведение (RB) или обработанного нейтрализующим реагентом (RA) должны быть меньше, либо равны 0,080.

Для этих же значений отрицательного контроля (R3) соотношение реактивности должно быть меньше 0,8.

Значения оптической плотности отрицательного контроля (R3) с добавлением контроля на разведение (RB) должны быть больше, чем 0,800.

Для этих же значений положительного контроля (R4) процент ингибирования должен быть больше или равен 50 %.

2. Для образцов с процентом ингибирования $> 0,5$ и соотношением реактивности $\geq 0,8$, необходимо провести повторное исследование, предварительно выполнив серию разведений сыворотки раствором для разведения образцов (1/10, 1/100, 1/1000 и т.д. 100 X). Степень разведения подбирать до тех пор, пока значение соотношения реактивности образца не станет $< 0,8$ (в этом случае образец считается неподтвержденным) или пока не будет достигнуто подтверждение ингибирования (т.е. процент ингибирования $\geq 0,5$).

4) Интерпретация результатов.

Образец считают подтвержденным на наличие HBs Ag, если соотношение реактивности больше или равно 0,8, а процент ингибирования больше или равен 50 %:

Соотношение реактивности	Процент ингибирования	Интерпретация
$\geq 0,8$	$\geq 50 \%$	Подтвержденный
$\geq 0,8$	$< 50 \%$	Неподтвержденный (необходимо разведение)
$< 0,8$	Любой результат	Не реактивный *

* Не подтвержденный для образцов после разведения

Пример:

Образец	Значение ОП с RA	Значение ОП с RB	Соотношение реактивности	Процент ингибиро- вания	Интерпретация результата
Положительный контроль (R4)	0,095	2,025	32,66	95 %	Подтвержденный
Отрицательный контроль (R3)	0,011	0,013	0,21	15 %	Не реактивный
Образец 1	0,009 0,007	0,027 0,023	0,40	68 %	Не реактивный
Образец 2	2,585 2,570	3,906 3,880	63,00	34 %	Не подтвержденный; Необходимо разведение
Образец 2 Развед. 1/100	0,049 0,045	2,079 2,058	33,36	98 %	Подтвержденный
Образец 3	0,132 0,140	0,151 0,161	2,52	13 %	Не подтвержденный; Необходимо разведение
Образец 3 Развед. 1/100	0,032 0,028	0,036 0,032	0,55	12 %	Не подтвержденный

12 – КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Характеристики МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ при совместном использовании с комплектом МОНОЛИЗА HBsAg УЛЬТРА были получены при исследовании образцов крови пациентов с острым и хроническим гепатитом В или с заболеваниями, несвязанными с гепатитом В, а так же коммерческих образцов и сероконверсионных панелей.

Кроме того, определяли предел чувствительности при исследовании французской официальной панели EFS HB и стандартов ВОЗ (NIBSC 00/588).

Аналитическая чувствительность

Все разведения образца панели EFS HB для определения чувствительности с концентрациями HBs антигена от 0,12 нг/мл до 2,2 нг/мл и все положительные образцы WHO NIBSC были подтверждены в тесте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ.

Чувствительность

Исследования чувствительности проводилось на 337 положительных образцах, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом острого и хронического гепатита В. Все положительные образцы были подтверждены в тесте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ.

Также исследовалось 15 документированных коммерческих сероконверсионных панелей HBV (45 образцов). Подтверждены все положительные образцы.

Специфичность и перекрестная реактивность

Были проанализированы 16 ложноположительных образцов из внутренней панели в тесте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ. Наличие антигена не было подтверждено ни в одном из образцов.

Исследования образцов от 102 пациентов с различными патологиями или физиологическими состояниями, несвязанными с гепатитом В (беременные женщины, ревматоидный фактор, анти-нуклеарные антитела, анти-мышинные антитела Ig, а также другие вирусные или бактериальные инфекции) в тесте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ продемонстрировали результаты, не подтверждающие наличие HBs Ag.

Кроме того, 37 образцов положительных на HBs Ag, а также положительных на другие маркеры (ревматоидный фактор, антитела, анти-мышинные антитела Ig или маркеры вирусных инфекций), были исследованы в тесте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ; во всех образцах подтверждено присутствие HBs Ag.

В 23 образцах, положительных по HBs антигену, из инфекционной панели ВВИ РСА 201 (содержащих вместе с маркерами ВГС, маркеры других инфекций ВИЧ, ВГС и / или HTLV) комплект МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ подтвердила наличие HBs антигена. Исследовались разведенные и неразведенные образцы.

Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ определяли при анализе 4 образцов: 1 отрицательный образец (образец 1), 2 HBs Ag положительных образца (образец 2 и 3) и 1 образец с высоким содержанием HBs Ag (образец 4).

Воспроизводимость в одной постановке оценивалась на указанных 4 в 30 повторяющихся пробах. Воспроизводимость между постановками исследовалась в повторных пробах указанных 4 образцов в течение 20 дней на двух независимых сериях исследований ежедневно. Результаты представлены в следующих таблицах:

Табл. 1: Воспроизводимость в одной постановке

N = 30	Образец №1	Образец №2	Образец №3	Образец №4
Среднее значение процента ингибирования	4	85,37	94,89	98,38
Стандартное отклонение (SD)	12,6	1,59	0,66	0,21
Коэффициент вариации CV (%)	-	1,86	0,69	0,22

Табл. 2: Воспроизводимость между постановками

N = 40	Образец №1	Образец №2	Образец №3	Образец №4
Среднее значение процента ингибирования	3,74	81,46	92,76	98,08
Стандартное отклонение (SD)	15,84	7,07	3,43	0,75
Коэффициент вариации CV (%)	-	8,68	3,70	0,76

Результаты, полученные при исследовании воспроизводимости, подтвердили ожидаемые расчетные значения.

12 – Границы применения набора

Реагенты комплекта МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ применяются исключительно для подтверждения присутствия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) в человеческой сыворотке или плазме.

Для образцов, которые в двух повторных исследованиях в комплекте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА продемонстрировали слабо положительный результат (коэффициент реактивности менее 2) и оказались не реактивными при исследовании не разведенной пробы в тесте МОНОЛИЗА HBs Ag УЛЬТРА ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ (соотношение реактивности менее 0,8), результаты следует интерпретировать с осторожностью. Рекомендуется обследовать пациента повторно другим методом или проанализировать новый образец полученный позже.

13 – Литература

См. французскую версию инструкции.

Скверное и
специальное
исследование
идеи

