



DiaSorin S.p.A.  
Via Crescentino snc - 13040 Saluggia (VC) - Italy  
www.diasorin.com  
Tel. +39.0161.4871



0459

## HBsAg Confirmatory Test (REF 310110)

(Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В)

### 1. ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) представляет собой анализ *in vitro* на нейтрализацию для подтверждения наличия поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в образцах сыворотки или плазмы человека, который неоднократно был определен, как реактивный на HBsAg, при исследовании LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant (REF 310250) или LIAISON® HBsAg (REF 310100).

### 2. КРАТКИЙ ОБЗОР И ПОЯСНЕНИЯ К ТЕСТУ

По причине выявления и взаимосвязи поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) с вирусным гепатитом типа В, проблема определения потенциальных инфекционных единиц крови стала критически важной. С этого момента были разработаны методы исследования с улучшенной чувствительностью и специфичностью для возможности определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) у популяции доноров и пациентов.

Несмотря высокую специфичность, которой удалось достигнуть этими методами исследования, существует вероятность получения ложных результатов реакции по причине наличия неспецифических мешающих веществ, артефактов в реагентах или типа используемого метода. Для снижения этой вероятности и во избежание ложных результатов реакции при диагностике инфекции вируса гепатита В (ВГВ), а также для удаления полезных единиц крови, были разработаны реакции нейтрализации для гарантии того, что HBsAg-реактивные результаты возникли по причине присутствия поверхностного антигена, а не по причине неспецифической интерференции.

### 3. ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) основан на принципе подавления связывания или нейтрализации активности связывания.

Нейтрализующий реагент, содержащий человеческие антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В, добавляется в одну аликвоту каждого образца, который был неоднократно реактивен (нейтрализованная аликвота). В качестве контрольной процедуры в другую аликвоту добавляется сыворотка человека, не содержащая антитела к поверхностному антигену ВГВ (не нейтрализованная аликвота). Если нейтрализующий реагент добавляется в образец, содержащий поверхностный антиген ВГВ, то антитела в нейтрализующем реагенте свяжутся с поверхностным антигеном ВГВ, образуя комплекс антиген-антитело. Если нейтрализующий реагент добавляется в образец, содержащий мешающее вещество, антитела в нейтрализующей реагенте не свяжутся с мешающим веществом. Может использоваться разбавление для обеспечения нейтрализации образцов с повышенной концентрацией поверхностного антигена ВГВ, которая может превысить потенциал нейтрализующего реагента подтверждающего теста на определение поверхностного антигена ВГВ.

В ходе проведения процедуры подтверждения каждый реактивный образец инкубируется в присутствии твердой матрицы, покрытой мышинными моноклональными антителами к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg), в результате чего на твердой матрице образуется либо комплекс антитело-антиген-антитело либо комплекс антитело-мешающее вещество.

Далее добавляется конъюгат антитела из набора для скрининга, который содержит антитела к поверхностному антигену ВГВ. Если присутствует комплекс антитело-антиген-антитело, то конъюгат антитела свяжется с комплексом только частично. Если присутствует комплекс антитело-

мешающее вещество, то конъюгат антитела свяжется неспецифически с мешающим веществом. Поэтому, если повторяющийся HBsAg-реактивный результат возникал по причине присутствия поверхностного антигена ВГВ в образце, то антитела в нейтрализующем реагенте нейтрализуют реактивность поверхностного антигена ВГВ, подавляя связывание конъюгата антитела. Итоговый сигнал будет более низким, чем сигнал, полученный в той аликвоте, к которой была добавлена сыворотка человека, не содержащая антитела к поверхностному антигену ВГВ.

И наоборот, если повторяющийся HBsAg-реактивный результат возникал по причине присутствия мешающего вещества, то антитела в нейтрализующем реагенте не нейтрализуют мешающее вещество, и конъюгат антитела свяжется с ним неспецифически. Итоговый сигнал будет таким же, что и сигнал, полученный в аликвоте, к которой была добавлена сыворотка человека, не содержащая антитела к поверхностному антигену ВГВ.

Если сигнал нейтрализованной аликвоты значительно ниже сигнала не нейтрализованной аликвоты, то присутствие поверхностного антигена вируса гепатита В в образце подтверждено.

#### 4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

Anti-HBs (1 флакон, 0.7 мл)	<b>Anti-HBs</b>	Сыворотка/плазма человека, содержащая как минимум 20000 мМЕ/мл anti-HBs антител по Второму международному стандарту ВОЗ для антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (anti-HBs) иммуноглобулин, человеческий (2008), 0.2% ProClin® 300, консерванты, инертный красный краситель (готовый к использованию)
Разбавитель образцов (1 флакон, 16 мл)	<b>DIL/SPE</b>	Сыворотка/плазма человека, отрицательная ко всем маркерам ВГВ, 0.2% ProClin® 300, консерванты (готовые к использованию)
Количество тестов		20 образцов, включая контроли

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМЫ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЕНЫ

**Для повторяющихся результатов с реакцией при исследовании LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant**  
LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant (REF 310250).

LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant отрицательный и положительный контроль (REF 310251).

Оборудование и материалы, которые необходимы для проведения исследования с LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant.

**Для повторяющихся результатов с реакцией при исследовании LIAISON® HBsAg**  
LIAISON® HBsAg (REF 310100).

LIAISON® HBsAg отрицательный и положительный контроль (REF 310101).

Оборудование и материалы, которые необходимы для проведения исследования с LIAISON® HBsAg.

#### 6. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для использования в диагностике *in vitro*.

Не перемешивайте реагенты и не заменяйте компоненты из наборов с разными номерами партий.

Все единицы сыворотки и плазмы, использованные для изготовления компонентов, предоставленных в данном наборе, были исследованы на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В, антитела к ВГС, антитела к ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-2 и признаны нереактивными. Однако, поскольку ни один метод исследования не может дать абсолютной гарантии отсутствия указанных патогенов, то все образцы человеческого происхождения должны считаться потенциально инфекционными и с ними следует обращаться с осторожностью.

Контроли LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant и LIAISON® HBsAg не специфичны для партии набора и могут свободно заменяться даже если они из разных партий. Характеристики производительности контролей LIAISON® не устанавливались для других исследований или инструментальных

платформ, кроме LIAISON®.

Если присутствие поверхностного антигена ВГВ не может быть подтверждено тестом нейтрализации, а подозрение на наличие инфекции есть, то предлагается провести оценку ВГВ-инфекции у лица посредством дополнительного обследования, например, других серологических маркеров ВГВ или ДНК ВГВ. Например, если поверхностный антиген ВГВ присутствует в низких количествах, в связи с неспецифической реактивностью, то нейтрализация может быть неполной, а также возможно (как и с любым нейтрализующим тестом), что в сыворотке находится мутировавший HBsAg, который не определяется.

Характеристики производительности раствора для разведения образцов LIAISON® XL MUREX Quant Specimen Diluent (REF310252) не были установлены для использования с подтверждающим тестом HBsAg Confirmatory Test на платформе LIAISON® XL и поэтому он не должен использоваться.

## 7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не употреблять пищу, не пить, не курить и не наносить косметические средства в лаборатории для проведения исследований.

Не пипетировать при помощи рта.


Избегайте прямого контакта с потенциально инфекционным материалом: одевайте лабораторную одежду, используйте защитные очки и одноразовые перчатки. Тщательно мойте руки в конце каждого исследования.

Не допускайте разбрызгивания или образования аэрозольных капель. Все капли биологического реагента должны быть удалены раствором гипохлорита натрия с 0,5% активным хлором, а используемые при этом материалы, должны рассматриваться как инфекционные отходы.

Все образцы и реагенты, содержащие биологические материалы, используемые в исследовании, должны считаться, как потенциально способные передавать инфекционные агенты. С отходами следует обращаться с осторожностью и утилизировать в соответствии с лабораторными правилами и нормативными положениями, действующими в каждой стране. Любые материалы, подлежащие повторному использованию, должны пройти соответствующую стерилизацию в соответствии с местным законодательством и инструкциями. Проверьте эффективность цикла стерилизации/деактивации.

Не используйте наборы или компоненты после истечения срока годности, указанного на этикетке.

В соответствии с Положением ЕС 1272/2008 (CLP) опасные реагенты классифицируются и маркируются следующим образом:

РЕАГЕНТЫ:	Anti-HBs, DIL   SPE
КЛАССИФИКАЦИЯ:	Кожный аллерген 1 H317
СИГНАЛЬНОЕ СЛОВО:	Предупреждение
Символы/ Пиктограммы:	 GHS07 Восклицательный знак
ХАРАКТЕРИСТИКА ОПАСНОСТЕЙ:	H317 Может вызвать аллергические реакции на коже
ПРЕДУПРЕДИТЕЛЬНЫЕ ФРАЗЫ:	P261 Избегайте вдыхания пыли/ газа / аэрозоля / паров / распылений. P280 Используйте защитные перчатки/защитную одежду / средства защиты глаз/защиты лица. P363 Стирайте загрязненную одежду перед повторным использованием.
СОДЕРЖИТ: (только для веществ, предписанных согласно Статье 18 Положения ЕС 1272/2008).	Реакционная масса: 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-один [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-2Н -изотиазол-3-один [ЕС № 220-239-6] (3:1) (ProClin® 300).

Для получения дополнительной информации смотрите Паспорт безопасности материала, который доступен по ссылке: [www.diasorin.com](http://www.diasorin.com).

## 8. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

При получении реагенты необходимо хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать. Если реагенты хранятся в запечатанном виде, то они стабильны при условии хранения при температуре 2-8°C до даты окончания срока годности. После вскрытия реагенты стабильны в течение **8 недель** при надлежащем хранении при температуре 2-8°C между двумя последовательными использованиями. Избегайте бактериального загрязнения. Реагенты не следует использовать после истечения срока годности, указанного на этикетках флакона.

## 9. Сбор и подготовка образцов

Может использоваться либо сыворотка, либо плазма человека. Несколько антикоагулянтов были протестированы и могут использоваться в этом исследовании. Для уточнения информации об использовании правильного образца, смотрите инструкции по исследованию. Забор крови должен быть произведен асептически методом венопункции; кровь должна свернуться, а сыворотка отделена от сгустка как можно скорее. Образцы, в которых содержатся взвешенные частицы, мутность, липемические или эритроцитные остатки, могут потребовать проведения фильтрации или центрифугирования перед исследованием. Сильно гемолизные или липемические образцы, а также образцы, содержащие взвешенные частицы или имеющие очевидное микробное загрязнение, не должны быть исследованы. Перед исследованием проверьте наличие воздушных пузырьков и удалите их. Если исследование будет проводиться в течение семи дней с момента забора образца, то образец можно хранить при температуре 2-8°C; в противном случае их следует разделить на аликвоты и хранить в условиях глубокой заморозки (-20°C и ниже). Если образцы хранились в замороженном виде, то перед исследованием необходимо перемешать оттаявшие образцы. Несколько образцов с различной реактивностью хранились в течение семи дней при температуре 2-8°C и были подвергнуты пяти циклам замораживания-оттаивания. Результаты не показали существенных различий.

**LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant** – Минимальный необходимый объем образца – 700 мкл для незначительно реактивных образцов (например со значением <5 МЕ/мл) и 20 мкл для сильно реактивных образцов (например со значением >5 МЕ/мл).

**LIAISON® HBsAg** - Минимальный необходимый объем образца – 700 мкл для незначительно реактивных образцов (например со значением индекса <50) и 20 мкл для сильно реактивных образцов (например со значением индекса >50).

## 10. Процедура исследования для **LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant** (REF 310250)

### Обработка образца

1. **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ И НЕЗНАЧИТЕЛЬНО РЕАКТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ** (значение <5 МЕ/мл): Смешайте 330 мкл образца и 33 мкл антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в одной пробирке (нейтрализованная аликвота), а также 330 мкл образца и 33 мкл Разбавителя образца подтверждающего теста на определение поверхностного антигена ВГВ (HBsAg Confirmatory Test specimen diluents) в другой пробирке (не нейтрализованная аликвота).

Инкубируйте образцы в течение одного часа ±5 минут при комнатной температуре (20-25°C). Обработайте контроли и образцы параллельно.

2. **СИЛЬНО РЕАКТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ** (значение >5 МЕ/мл):

Разведите образцы в пропорции 1:10,000 при помощи Разбавителя образца подтверждающего теста на определение поверхностного антигена ВГВ (HBsAg Confirmatory Test specimen diluents) перед исследованием. Действуйте следующим образом:

Дозируйте 4 мкл каждого образца и 36 мкл Разбавителя образца в лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания (1:10 промежуточное предварительное разбавление).

Дозируйте 4 мкл промежуточного предварительно разбавленного 1:10 вещества и 36 мкл Разбавителя образца в чистые лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания (1:100 промежуточное

предварительное разбавление).

Дозируйте 7 мкл промежуточного предварительно разбавленного 1:100 вещества и 693 мкл Разбавителя образца в чистые лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания (1:10,000 предварительное разбавление). Предварительно разбавленные вещества можно хранить при температуре 2-8°C в течение 24 часов.

Смешайте 330 мкл разбавленного образца и 33 мкл антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в одной пробирке (нейтрализованная аликвота), а также 330 мкл разбавленного образца и 33 мкл Разбавителя образца в другой пробирке (не нейтрализованная аликвота).

Инкубируйте образцы в течение одного часа  $\pm 5$  минут при комнатной температуре (20-25°C).

Если значение предварительно разбавленного вещества 1:10,000 все же выше 10 МЕ/мл для не нейтрализованной аликвоты, то повторите тест после дополнительного разбавления образца в пропорции 1:20 (напр., 35 мкл предварительно разбавленного образца 1:10,000 + 665 мкл Разбавителя образца).

Если значение предварительно разбавленного вещества 1:10,000 менее 0.045 МЕ/мл для не нейтрализованной аликвоты, повторите тест с использованием промежуточного предварительно разбавленного вещества 1:100. Действуйте следующим образом: Дозируйте 7 мкл каждого образца и 693 мкл Разбавителя образца в лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания.

### **Процедура анализа**

Исследуйте положительные и отрицательные контроли LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant при проведении анализа каждого образца. Для надлежащего выполнения анализа следует строго следовать руководству пользователя по анализатору. Каждый тестируемый параметр идентифицируется через информацию, закодированную во встроенной метке радиочастотной идентификации (RFID-метка). В том случае, когда анализатор не может считать RFID-метку, встроенный компонент не может использоваться. Не выбрасывайте интегральный компонент реагента; свяжитесь с местной службой технической поддержки DiaSorin для получения инструкций по действию.

Действия анализатора следующие:

1. Дозирование калибраторов теста LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant в реакционные кюветы (при необходимости).
2. Дозирование одного необработанного отрицательного контроля, одного необработанного положительного контроля и двух положительных контролей (нейтрализованная и не нейтрализованная аликвота) из контрольного набора LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant в реакционные кюветы.
3. Дозирование образцов в двух экземплярах (а именно нейтрализованную и не нейтрализованную аликвоту) в реакционные кюветы.
4. Дозирование буфера J.
5. Распределение покрытых магнитных частиц.
6. Инкубация.
7. Промывка промывающей жидкостью / системной жидкостью.
8. Дозирование конъюгата в реакционные кюветы.
9. Дозирование буфера J.
10. Инкубация.
11. Промывка промывающей жидкостью / системной жидкостью.
12. Добавление стартовых реагентов и измерение излучаемого света.

### **11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ДЛЯ LIAISON® XL MUREX HBsAg QUANT**

Рекомендуется проводить контроль качества один раз в день использования или в соответствии с положениями или требованиями местных нормативных актов или аккредитованных организаций. Необработанные отрицательные и положительные контроли не могут использоваться для анализа, если в этот уже был проведен тест LIAISON® XL MUREX HBsAg QUANT.

Контроли LIAISON® доступны для внутреннего контроля качества. Если значения контролей выходят за границы ожидаемого диапазона, то необходимо повторить калибровку и повторно протестировать контроли.

Производительность других контролей необходимо оценивать на совместимость с данным анализом до момента их использования. Затем для используемых материалов контроля качества следует установить соответствующие диапазоны значений.

## 12. Подсчет результатов для LIAISON® XL MUREX HBsAg QUANT

Процент нейтрализации подсчитывается по следующей формуле:

$$\frac{\text{RLU для не нейтрализованной аликвоты} - \text{RLU для нейтрализованной аликвоты}}{\text{RLU для не нейтрализованной аликвоты} - \text{RLU для отрицательного контроля теста HBsAg}} \times 100$$

RLU – относительная световая единица

## 13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ LIAISON® XL MUREX HBsAg QUANT

Тест является действительным, если нейтрализация положительной контроли LIAISON® XL MUREX HBsAg (REF 310251) составила минимум 50%. Образец не подтвержден, как положительный, если значение не нейтрализованной аликвоты (смешанной с Разбавителем образца) составило менее 0.045 МЕ/мл, независимо от результата нейтрализации, выраженной в процентах (=отрицательный образец).

Образец не подтвержден, как положительный, если значение не нейтрализованной аликвоты (смешанной с Разбавителем образца) равно или более 0.045 МЕ/мл, а процент нейтрализации составил менее 50% (=наличие мешающего вещества).

Образец подтвержден, как положительный, если значение не нейтрализованной аликвоты (смешанной с Разбавителем образца) равно или более 0.045 МЕ/мл, а процент нейтрализации равен или больше 50%.

Образец следует еще раз разбавить Разбавителем образца подтверждающего теста на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test specimen diluent) (до концентрации 1:200,000) и повторить нейтрализацию, если значение не нейтрализованной аликвоты (смешанной с Разбавителем образца) превысило 5 МЕ/мл (чистый образец) или 10 МЕ/мл (разбавленный образец), а процент нейтрализации составил менее 50%.

Разбавление образца	МЕ/мл (не нейтрализованная аликвота)	% нейтрализации	Интерпретация результатов
Неразбавленный	< 0.045	любое значение	Не подтвержден (HBsAg-отрицательный образец)
	0.045-5	< 50%	Не подтвержден (мешающее вещество)
	≥ 0.045	≥ 50%	Подтвержден (реально HBsAg-положительный образец)
1:10,000	< 0.045	любое значение	Повторный тест 1:100 разбавление
	0.045-10	< 50%	Не подтвержден (мешающее вещество)
	≥ 0.045	≥ 50%	Подтвержден (реально HBsAg-положительный образец)
1:100	> 10	< 50%	Дальнейшее разбавление (1:200,000) и повторный тест
	0.045-10	< 50%	Не подтвержден (мешающее вещество)
1:200,000	≥ 0.045	≥ 50%	Подтвержден (реально HBsAg-положительный образец)
	0.045-10	< 50%	Не подтвержден (мешающее вещество)
	≥ 0.045	≥ 50%	Подтвержден (реально HBsAg-положительный образец)

### Пример подсчета

#### Пример 1

RLU для не нейтрализованной аликвоты	= 322,764	Значение = 22 МЕ/мл
RLU для нейтрализованной аликвоты	= 59,291	
RLU для отрицательного контроля теста HBsAg	= 413	

$$\frac{322,764 - 59,291}{322,764 - 413} \times 100 = 82\% \text{ - положительный образец}$$

#### Пример 2

RLU для не нейтрализованной аликвоты	= 241,135	Значение = 16 МЕ/мл
RLU для нейтрализованной аликвоты	= 201,524	
RLU для отрицательного контроля теста HBsAg	= 413	

$$\frac{241,135 - 201,524}{241,135 - 413} \times 100 = 16\% \text{ - не подтвержденный образец}$$

## 14. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ LIAISON® XL MUREX HBsAg QUANT

### 14.1. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена, как возможность анализа корректно классифицировать образцы, то есть нейтрализовать поверхностный антиген вируса гепатита В в присутствии потенциально мешающих факторов в матрице образца (напр. антикоагулянтов, гемолиза, эффектов обработки образца) и избегать нейтрализации веществ, обладающих перекрестной реактивностью.

**Интерференция.** Контролируемые исследования потенциально мешающих веществ или условий показали, что на производительность анализа не повлияли антикоагулянты (цитрат натрия, калиевая ЭДТК, литий и натрий гепарин, оксалат калия, цитрат декстрозы, цитрат-фосфат-декстроза-аденин), гемолиз (до 1000 мг/дл гемоглобина), липемия (до 3000 мг/дл триглицеридов), билирубинемия (до 20 мг/дл билирубина), а также ограниченное количество циклов замораживания-оттаивания образцов или использование свежесобранных образцов.

### 14.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность оценивалась методом тестирования серийных разведений Второго международного стандарта для поверхностного антигена вируса гепатита В, подтип adw2, генотип А, Код Национального института биологических стандартов и контроля (NIBSC): 00/588. Каждое разведение обрабатывалась в соответствии с указаниями, приведенными в руководстве по использованию Подтверждающего теста на определение поверхностного антигена вируса гепатита В. При проведении анализа с использованием LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant, все разведения были корректно нейтрализованы.

Затем аналитическая чувствительность подсчитывалась посредством вставки сигнала не нейтрализованных аликвот из вышеуказанной кривой разведения вокруг точки, которая соответствует пороговому значению, и была определена, как не превышающая 0.130 МЕ/мл, как того требует Общая техническая спецификация 2009/886/ЕС.

### 14.3. Воспроизводимость

Четыре образца, содержащие различные концентрации поверхностного антигена вируса гепатита В, обрабатывались по отдельности и исследовались в параллельных анализах в количестве 20 для определения воспроизводимости нейтрализации. Затем подсчитывался процент нейтрализации для каждого репликата образца. Разнообразие, приведенное в таблице ниже, не привело к ошибке классификации образца.

Воспроизводимость	A	B	C	D
Количество определений	20	20	20	20
Средняя нейтрализация (%)	98.0	99.0	97.0	101.0
Стандартное отклонение	0.8	1.1	0.3	0.3
Коэффициент вариации (%)	0.83	1.07	0.36	0.34

#### 14.4. Диагностическая специфичность и чувствительность

Диагностическая специфичность оценивалась посредством тестирования одного образца, дающего постоянные реактивные результаты по тесту LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant, но который был известен, как ложно положительный образец. Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) корректно не подтвердил этот образец.

Диагностическая чувствительность оценивалась посредством тестирования 118 образцов, дающих постоянные реактивные результаты по тесту LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant, и которые были известны, как действительно положительные образцы (здоровые носители поверхностного антигена вируса гепатита В, пациенты с острым и хроническим гепатитом В).

Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) корректно подтвердил эти образцы, как положительные (диагностическая чувствительность: 100% - 95% доверительный интервал: 96,9-100%).

#### 15. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ LIAISON® HBsAg (REF 310100)

##### Обработка образца

1. ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ И НЕЗНАЧИТЕЛЬНО РЕАКТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ (значение индекса <50):

Смешайте 330 мкл образца и 33 мкл антител к гепатиту В в одной пробирке (нейтрализованная аликвота), а также 330 мкл образца и 33 мкл Разбавителя образца в другой пробирке (не нейтрализованная аликвота).

Инкубируйте образцы в течение одного часа  $\pm 5$  минут при комнатной температуре (20-25°C). Обработывайте контроли и образцы параллельно.

2. СИЛЬНО РЕАКТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ (значение индекса >50):

Разведите образцы в пропорции 1:10,000 при помощи Разбавителя образца перед исследованием. Действуйте следующим образом:

Дозируйте 4 мкл каждого образца и 36 мкл Разбавителя образца в лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания (1:10 промежуточное предварительное разбавление).

Дозируйте 4 мкл промежуточного предварительно разбавленного 1:10 вещества и 36 мкл Разбавителя образца в чистые лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания (1:100 промежуточное предварительное разбавление).

Дозируйте 7 мкл промежуточного предварительно разбавленного 1:100 вещества и 693 мкл Разбавителя образца в чистые лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания (1:10,000 предварительное разбавление). Предварительно разбавленные вещества можно хранить при температуре 2-8°C в течение 24 часов.

Смешайте 330 мкл разбавленного образца и 33 мкл антител к гепатиту В в одной пробирке (нейтрализованная аликвота), а также 330 мкл разбавленного образца и 33 мкл Разбавителя образца в другой пробирке (не нейтрализованная аликвота).

Инкубируйте образцы в течение одного часа  $\pm 5$  минут при комнатной температуре (20-25°C).

Если значение индекса предварительно разбавленного вещества 1:10,000 все же выше 100 для не нейтрализованной аликвоты, то повторите тест после дополнительного разбавления образца в пропорции 1:20 (напр., 35 мкл предварительно разбавленного образца 1:10,000 + 665 мкл Разбавителя образца).

Если значение индекса предварительно разбавленного вещества 1:10,000 менее 0,9 для не



нейтрализованной аликвоты, повторите тест с использованием промежуточного предварительно разбавленного образца в пропорции 1:100. Действуйте следующим образом: Дозируйте 7 мкл каждого образца и 693 мкл Разбавителя образца в лабораторные пробирки и тщательно смешайте при помощи вихревого смесителя для обеспечения надлежащего смешивания.

### Процедура анализа

Исследуйте положительные и отрицательные контроли LIAISON® HBsAg при проведении анализа каждого образца. Для надлежащего выполнения анализа следует строго следовать руководству пользователя по анализатору. Каждый тестируемый параметр идентифицируется через штрих-коды, расположенные на этикетке реагента. В том случае, если анализатор не может считать штрих-код, встроенный компонент не может использоваться. Не выбрасывайте интегральный компонент реагента; свяжитесь с местной службой технической поддержки DiaSorin для получения инструкций по действию.

Действия анализаторы следующие:

1. Дозирование калибраторов теста LIAISON® HBsAg в реакционный модуль (при необходимости).
2. Дозирование одного необработанного отрицательного контроля, одного необработанного положительного контроля и двух положительных контролей (нейтрализованная и не нейтрализованная аликвота) из контрольного набора LIAISON® HBsAg в реакционный модуль.
3. Дозирование образцов в двух экземплярах (а именно нейтрализованную и не нейтрализованную аликвоту) в реакционный модуль.
4. Дозирование буфера С.
5. Распределение покрытых магнитных частиц.
6. Инкубация.
7. Дозирование конъюгата в реакционный модуль
8. Инкубация.
9. Промывка промывающей жидкостью / системной жидкостью.
10. Добавление стартовых реагентов и измерение излучаемого света.

### 16. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ДЛЯ LIAISON® HBsAg

Рекомендуется проводить контроль качества один раз в день использования или в соответствии с положениями или требованиями местных нормативных актов или аккредитованных организаций. Необработанные отрицательные и положительные контроли не могут использоваться для анализа, если в этот день уже был проведен тест LIAISON® HBsAg.

Контроли LIAISON® доступны для внутреннего контроля качества. Если значения контролей выходят за границы ожидаемого диапазона, то необходимо повторить калибровку и повторно протестировать контроли.

Производительность других контролей необходимо оценивать на совместимость с данным анализом до момента их использования. Затем для используемых материалов контроля качества следует установить соответствующие диапазоны значений.

### 17. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ LIAISON® HBsAg

Процент нейтрализации подсчитывается по следующей формуле:

$$\frac{\text{RLU для не нейтрализованной аликвоты} - \text{RLU для нейтрализованной аликвоты}}{\text{RLU для не нейтрализованной аликвоты} - \text{RLU для отрицательного контроля теста HBsAg}} \times 100$$

RLU – относительная световая единица

### 18. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ LIAISON® HBsAg

Тест является действительным, если нейтрализация положительной контроли LIAISON® HBsAg (REF 310101) составила минимум 50%.

Образец не подтвержден, как положительный, если значение индекса не нейтрализованной аликвоты (смешанной с Разбавителем образца) составило менее 0.9 независимо от результата нейтрализации, выраженной в процентах (=отрицательный образец).



## 19. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ LIAISON® HBsAg

### 19.1. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена, как возможность анализа корректно классифицировать образцы, то есть нейтрализовать поверхностный антиген вируса гепатита В в присутствии потенциально мешающих факторов в матрице образца (напр. антикоагулянтов, гемолиза, эффектов обработки образца) и избегать нейтрализации веществ, обладающих перекрестной реактивностью.

**Интерференция.** Контролируемые исследования потенциально мешающих веществ или условий показали, что на производительность анализа не повлияли антикоагулянты (цитрат, ЭДТК, гепарин), гемолиз (до 100 мг/дл гемоглобина), липемия (до 3000 мг/дл триглицеридов), билирубинемия (до 20 мг/дл билирубина), а также циклы замораживания-оттаивания образцов.

### 19.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность оценивалась методом тестирования серийных разведений Второго международного стандарта для поверхностного антигена вируса гепатита В, подтип adw2, генотип А, Код Национального института биологических стандартов и контроля (NIBSC): 00/588. Каждое разведение обрабатывалась в соответствии с указаниями, приведенными в руководстве по использованию Подтверждающего теста на определение поверхностного антигена вируса гепатита В. При проведении анализа с использованием LIAISON® HBsAg, все разведения были корректно нейтрализованы.

Затем аналитическая чувствительность подсчитывалась посредством вставки сигнала не нейтрализованных аликвот из вышеуказанной кривой разведения вокруг точки, которая соответствует пороговому значению, и была определена, как не превышающая 0.130 МЕ/мл, как того требует Общая техническая спецификация 2009/886/ЕС.

### 19.3. Воспроизводимость

Четыре образца, содержащие различные концентрации поверхностного антигена вируса гепатита В, обрабатывались по отдельности и исследовались в параллельных анализах в количестве 22 для определения воспроизводимости нейтрализации. Затем подсчитывался процент нейтрализации для каждого репликата образца. Разнообразие, приведенное в таблице ниже, не привело к ошибке классификации образца.

Воспроизводимость	A	B	C	D
Количество определений	22	22	22	22
Средняя нейтрализация (%)	87.8	89.9	87.8	88.1
Стандартное отклонение	1.0	1.1	6.9	4.5
Коэффициент вариации (%)	1.1	1.2	7.8	5.1

### 19.4. Диагностическая специфичность и чувствительность

Диагностическая специфичность оценивалась посредством тестирования 20 образцов, дающих постоянные реактивные результаты по тесту LIAISON® HBsAg, но которые были известны, как ложно положительные образцы. Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) корректно не подтвердил эти образцы.

Диагностическая чувствительность оценивалась посредством тестирования 462 образцов, дающих постоянные реактивные результаты по тесту LIAISON® HBsAg, и которые были известны, как действительно положительные образцы (здоровые носители поверхностного антигена вируса гепатита В, пациенты с острым и хроническим гепатитом В). Из них 388 были простыми образцами, 74 были сероконверсионные образцы или последующими образцами от 19 пациентов. Подтверждающий тест на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) корректно подтвердил эти образцы, как положительные (**диагностическая чувствительность: 100%** - 95% доверительный интервал: 99,2-100%).

Тестировались HBsAg-реактивные образцы (подтипы ad и ay), относящиеся к 30 сероконверсионным панелям, каждый начинающийся с отрицательного выделения и

демонстрирующий узкие интервалы выделения. В каждую панель была включена серия неразбавленных образцов, с низкой концентрацией поверхностного антигена вируса гепатита В. HBsAg-реактивные образцы были подвергнуты нейтрализации Подтверждающим тестом на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) и по каждому образцу был подсчитан процент нейтрализации. Все образцы были нейтрализованы в степени, намного превышающей пороговое значение (50% нейтрализация), и, следовательно, были подтверждены как положительные.

Кроме того, 20 высоко положительных образцов (свыше 26 МЕ/мл) и 20 низко положительных образцов были нейтрализованы Подтверждающим тестом на определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg Confirmatory Test) и по каждому образцу был подсчитан процент нейтрализации. Все образцы были нейтрализованы в степени, намного превышающей пороговое значение (50% нейтрализация), и, следовательно, были подтверждены как положительные.

## Литература

1. B.S. BLUMBERG, H.J. ALTER  
A "new" antigen in leukemia sera.  
JAMA, **191** (7) : 101-106 (1965).
2. A.B. CHRISTIE  
Infectious Diseases: epidemiology and clinical practice, Churchill Livingstone, London, p. 447-518 (1980).
3. B.J. COHEN, J.E. RICHMOND  
Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*.  
Nature, **296** (5858) : 677-679 (1982).
4. G. DUSHEIKO, J.H. HOOFNAGLE  
Hepatitis B.  
In: Oxford Textbook of Clinical Hepatology, N. McIntyre et al. eds., Oxford University Press, p. 571-577 (1991).
5. M.R. ESCOBAR  
Chronic viral hepatitis.  
In: Clinical Virology Manual, S. Specter, G.J. Lancz eds., Elsevier, New York, p. 329-348 (1986).
6. M.A. FEITELSON  
Biology of hepatitis B virus variants.  
Lab. Invest., **71** (3) : 324 (1994).
7. G. FATTOVICH et al.  
Hepatitis B virus precore/core variation and interferon therapy.  
Hepatology, **22** (5) : 1355-1362 (1995).
8. W.H. GERLICH et al.  
Specificity and localization of the hepatitis virus-associated protein kinase.  
J. Virol., **42** (3) : 761-766 (1982).
9. W.H. GERLICH, R. THOMSEN  
Terminology, structure, and laboratory diagnosis of hepatitis viruses.  
In: Oxford Textbook of Clinical Hepatology, N. McIntyre et al. eds., Oxford University Press, p. 543-560 (1991).
10. K.H. HEERMANN et al.  
Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence.  
J. Virol., **52** (2) : 396-402 (1984).
11. S.Z. HIRSCHMAN  
Hepatitis viruses - Viral hepatitis.  
In: Infectious Diseases and Medical Microbiology, A.I. Braude, C.E. Davis, J. Fierer eds., W.B. Saunders, Philadelphia, 2nd edition, p. 557-564  
and p. 989-995 (1986).
12. J.H. HOOFNAGLE, H.J. ALTER  
Chronic viral hepatitis.  
In: Viral Hepatitis and Liver Disease, G.N. Vyas, J.L. Dienstag, J.H. Hoofnagle eds., Grune & Stratton, New York, p. 97-113 (1984).
13. E.E. MAST, H.J. ALTER  
Epidemiology of viral hepatitis: an overview.  
Sem. Virol., **4** : 273-283 (1993).
14. D.R. MILICH, A. McLACHLAN  
The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen.  
Science, **234** (4782) : 1398-1401 (1986).
15. D. MORADPOUR, J.R. WANDS  
Understanding hepatitis B virus infection.  
N.E.J. Med., **332** (16) : 1092-1093 (1995).
16. H. NORDER et al.  
Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis surface antigen and genomic classification of the

- corresponding  
hepatitis B virus strain.  
J. Gen. Virol., **73** : 1201-1208 (1992).
17. K.I. OHBA et al.  
Relationship between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes.  
Virus Res., **39** : 25-34 (1995).
18. M. RIZZETTO, G. LANFRANCO, R. PAGNI, G. VERME  
The diagnostic approach to chronic hepatitis.  
In: Advances in Hepatobiliary and Pancreatic Diseases: special clinical topics, G. Dobrilla, M. Felder, G. De Pretis eds., Kluwer Academic Publ.,  
p. 3-13 (1995).
19. H.J. SCLICHT, J. SALFELD, H. SCHALLER  
The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation.  
J. Virol., **61** (12) : 3701-3709 (1987).
20. W. SZMUNESS  
Recent advances in the study of the epidemiology of hepatitis B.  
Am. J. Pathol., **81** (3) : 629-650 (1975).
21. T. UCHIDA  
Genetic variations of the hepatitis B virus and their clinical relevance.  
Microbiol. Immunol., **37** (6) : 425-439 (1993).
22. Morbidity and Mortality Weekly Report. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, p. 43-53 (1995).
- Дополнительная литература**
- T.F. BAUMERT et al.  
Pathogenesis of hepatitis B virus infection.  
World J. Gastroenterol., **13** (1) : 82-90 (2007).
- M.R. BRUNETTO, U.A. RODRIGUEZ, F. BONINO  
Hepatitis B virus mutants.  
Intervirology, **42** : 69-80 (1999).
- EUROPEAN PATENT Application EP 1 806 363 A1, 2007; Bulletin 2007/28.
- S. IJAZ et al.  
A 'first loop' linear epitope accessible on native hepatitis B surface antigen that persists in the face of 'second loop' immune escape.  
J. Gen. Vir., **84** : 269-275 (2003).
- J.M. JONGERIUS et al.  
New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays.  
Transfusion, **38** : 56-59 (1998).
- E. KAJIWARA et al.  
Hepatitis B caused by a hepatitis B surface antigen escape mutant.  
J. Gastroenterol., **43** : 243-247 (2008).
- S. LEVICNIK-STEZINAR  
Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay.  
Clin. Lab., **50** : 49-51 (2004).
- T.D. LY et al.  
Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms.  
J. Clin. Microbiol., **44** (7) : 2321-2326 (2006).
- T.D. LY  
Detection of HBsAg mutants by immunoassays.  
J. Med. Virol., **79** : S37-S41 (2007).
- K.M. WEINBERGER et al.  
High genetic variability of the group-specific *a*-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum.  
J. Gen. Virol., **81** : 1165-1174 (2000)