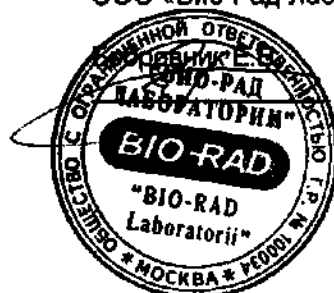


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»



2008 г.

Инструкция по применению изделия медицинского назначения тест-системы для диагностики in vitro ВИЧ-1 комплекта «Дженетик Системс ВИЧ-1 Аг ИФА» (Genetic Systems HIV-1 Antigen EIA)

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Возбудителем Синдрома Приобретенного Иммунодефицита (СПИД) является ретровирус, который был назван Вирусом Иммунодефицита Человека (ВИЧ). ВИЧ обнаруживается у пациентов со СПИДом, а также у лиц, принадлежащих к группе высокого риска по СПИДу, без очевидной симптоматики. Известно, что передача вируса происходит при сексуальных контактах, при использовании инфицированных игл, при переливании зараженной крови и перинатально, от инфицированной матери плоду или ребенку.

Доказательством присутствия ВИЧ обычно является наличие вирусоспецифических антител в сыворотке или плазме крови пациентов. Перед появлением антител существует период времени, когда в крови циркулируют только ВИЧ-антигены. Одним из этих вирусных антигенов является р24 – основной ядерный белок вируса. Тест-системы для обнаружения ВИЧ антигенов могут, таким образом, выявлять ВИЧ-инфекцию еще до сероконверсии. Продолжительность периода антигенемии, предшествующего появлению антител к ВИЧ, у разных инфицированных лиц

может быть различна и составлять интервал от нескольких дней до недель. В течение периода сероконверсии вирусоспецифические антитела образуют комплексы с циркулирующим антигеном, и количество свободного антигена в крови снижается, иногда до полного его исчезновения. Позднее, по мере прогрессирования заболевания антигенемия может развиваться снова.

2. ПРИНЦИП ТЕСТА

«Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА»- иммуноферментная тест-система для выявления антигена ВИЧ-1 (p24) в образцах сыворотки или плазмы крови человека. «Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ Подтверждающий» (кат. номер 71121) является дополнительным тестом, который используется совместно с тест-системой «Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА» для подтверждения наличия ВИЧ p24 антигена в повторно положительных образцах.

В набор «Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА», в качестве твердой фазы, входит микропланшет, в лунках которого сорбированы мышинные моноклональные антитела к ВИЧ-1 антигену. В качестве первого конъюгата используются биотинилированные овечьи анти-p24 антитела, в качестве второго конъюгата используется авидин, связанный с пероксидазой.

Ход выполнения процедуры тестирования состоит из следующих шагов:

1. Во все лунки микропланшета вносится Раствор для разведения образцов. Затем в соответствующие лунки вносятся исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови человека и контроли. Если в образце присутствует ВИЧ-1 антиген, он связывается с антителами, фиксированными на твердой фазе. Весь ВИЧ-1 антиген, связавшийся с твердой фазой, остается в лунках после процедуры промывания планшета. Подтверждением тому, что образцы (контроли) были внесены в лунки, становится изменение цвета Раствора для разведения образцов с зеленого на голубой.

2. Затем во все лунки добавляется Конъюгат 1, и планшет инкубируется. Это позволяет биотинилированным овечьим анти-p24 антителам Конъюгата 1 связаться с ВИЧ-1 антигеном, связавшимся в лунках планшета. Комплекс антиген-антитело остается связанным с твердой фазой после последующего промывания.

3. После промывки в лунки добавляется Конъюгат 2, и планшет снова инкубируется. Авидин в составе Конъюгата 2 специфически связывается с комплексом антитело-ВИЧ-1-антиген. Весь не связавшийся конъюгат удаляется промыванием.

4. Приготовленный рабочий субстратный ТМБ раствор вносится во все лунки, и микропланшет инкубируется. Интенсивность развития синей или сине-зеленой окраски пропорциональна количеству ВИЧ-1 антигена в образце. Цветовая реакция останавливается добавлением кислоты, которая меняет сине-зеленую окраску в лунках на желтую. Оптическая плотность образцов и контролей измеряется на спектрофотометре при длине волны 450/620-700 нм.

3. СОСТАВ

Этикетка	Описание реагента	Фасовка
R1	Микропланшет 12 стрипов по 8 лунок, покрытых мышинными моноклональными антителами к ВИЧ-1 (p24), Консервант - ProClin™ 300, азид натрия (<0,1% азида натрия)	2 микропланшета
R2	Концентрат промывающего раствора (20х) Трис-NaCl раствор pH = 7,4 Консервант: ProClin 300 (0.04%)	1 фл 235 мл
R3	Раствор для разведения образцов Консервант - 0.5% ProClin™ 300 Краситель образцов (зеленый)	1 флакон 20 мл
CO	Контрольный отрицательный образец Сыворотка крови человека, не содержащая, по результатам ИФА, антигена ВИЧ-1, HBs антигена, антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, антител к ВГС и вирусу Т-клеточного лейкоза с 0.005% гентамицин сульфатом. Консервант — 0,5% ProClin™ 300	1 флакон 10 мл
C1	Контрольный положительный образец Очищенный, инактивированный Антиген ВИЧ – 1 Консервант - 0.5% ProClin™ 300	1 флакон 7 мл
R4	Концентрированный конъюгат 1 (концентрат x100) Овечий анти-p24 конъюгат с 0.005% гентамицин сульфатом. Желтый краситель Консервант - 0.5% ProClin™ 300.	1 флакон 1 мл
R5	Концентрированный конъюгат 2 (концентрат x100) Авидин, конъюгированный с пероксидазой, с добавлением 0.005% гентамицина сульфата. Зеленый краситель	1 флакон 1 мл
R6	Раствор для разведения конъюгатов Буферный раствор, содержащий белковые стабилизаторы Консервант - 0.5% ProClin™ 300	1 флакон 100 мл
R8	Субстратный буфер Буферный раствор, содержащий ацетат натрия, лимонную кислоту, pH 4,0 0.015% перекись водорода, диметилсульфоксид	1 флакон 60 мл
R9	Хромоген Тетраметилбензидин (ТМБ)	1 флакон 5 мл
R10	СТОП-раствор 1N серная кислота	2 флакона 2x28мл
	Самоклеющаяся пленка для микропланшетов	25 шт.

4. НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Дистиллированная или деионизованная вода.

- Концентрированный раствор гипохлорита натрия (5–8%), который должен быть разведен до рабочей 10% концентрации (или 0.5% раствора гипохлорит натрия). Альтернативным дезинфектантом может быть 70% этанол или 0,5% Вескодин.
- Автоматические или полуавтоматические пипетки на объемы от 10 до 200 мкл, 1 мл, 5 мл, 10 мл (с точностью $\pm 10\%$). Многоканальная пипетка для внесения 100 или 200 мкл (для удобства, не обязательна)
- Мерная посуда на 25, 100 и 1000 мл.
- Контейнер для контаминированных отходов.
- Водяная баня или специальный термостат для микропланшетов* $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Автоматический*, полуавтоматический* или ручной промыватель для микропланшетов.
- Спектрофотометр для микропланшетов* с фильтрами на 450 и 620 — 700 нм.
- Емкости для реагентов (при необходимости)
- Фильтровальная бумага.
- Одноразовые перчатки.
- Чистые стеклянные или одноразовые пластиковые емкости (полистироловые или полипропиленовые) для приготовления рабочего раствора конъюгата и раствора ТМБ
- Культуральная среда, например RPMI-1640, содержащая 10% сыворотку теленка, эквивалентная той, которая используется для инфекционной клеточной культуры (если тестируются образцы клеточной культуры)

* Обращайтесь в представительство компании Био-Рад за подробной информацией о рекомендованном оборудовании

5. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты, входящие в состав наборов предназначены только для диагностики *in vitro*.

- При работе с реагентами и пробами пользуйтесь одноразовыми перчатками. После работы тщательно мойте руки.
- Не пипетируйте ртом.
- Человеческий материал, использованный для приготовления отрицательного контрольного образца, при тестировании не содержал маркеры антигена ВИЧ-1, HBs антигена, антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, ВГС и вирусу Т-клеточного лейкоза 1 и 2 (HTLV-1/2).
- Положительный контрольный образец инактивирован термообработкой с детергентом.
- Поскольку, как известно, ни один из методов тестирования не может гарантировать отсутствие ВИЧ, вирусов гепатита В или С или других инфекционных агентов, следует рассматривать этот материал как потенциально инфицированный, так же, как и образцы пациентов, и работать с соответствующими мерами предосторожности.
- Любое оборудование, непосредственно контактировавшее с образцами и реагентами человеческого происхождения, так же, как и буферные растворы, следует считать инфицированными и обращаться с ними с соответствующими мерами предосторожности.
- Не проливайте пробы или реагенты, содержащие пробы.
- Поверхность, на которую была пролита жидкость, должна быть обработана 10 % раствором хлорной извести. В случае если пролит раствор кислоты, разлитая

жидкость, прежде всего, должна быть нейтрализована бикарбонатом натрия, потом хлорной известью, а потом собрана с помощью фильтровальной бумаги. Материалы, используемые для ликвидации последствий разлива жидкости, следует поместить в контейнер для загрязненных отходов.

- Пробы и реагенты человеческого происхождения, а также загрязненные вещества и продукты должны выбрасываться только после дезинфекции.
 - Дезинфекция производится при замачивании в растворе гипохлорита натрия с конечной концентрацией 5 % (в объемном соотношении 1 часть дезинфицирующего вещества на 10 частей обеззараживаемой жидкости или воды) в течение 30 минут,
 - или автоклавированием при 121 °C в течение не менее 2 часов.
- Автоклавирование является лучшим способом инактивирования ВГВ и ВИЧ
- ВНИМАНИЕ! НЕ ПОДВЕРГАЙТЕ АВТОКЛАВИРОВАНИЮ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИТ НАТРИЯ.**
- Не допускайте попадания на кожу и слизистые оболочки субстратного буфера, хромогена и стоп-раствора (могут быть токсичными, вызывать раздражение и ожоги).
- Растворы, использованные для промывки, или любая жидкость, содержащая элементы биологической пробы, должны попадать в слив только после нейтрализации и/или автоклавирования.
- Работа с химическими материалами и их утилизация должна выполняться в соответствии с правилами Хорошей Лабораторной Практики.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Это вещество способно взаимодействовать со свинцом или медью, образуя взрывоопасные азиды металлов. Чтобы предотвратить аккумуляцию азидов в трубах, до слива этих реагентов в раковину они должны быть нейтрализованы, а раковина промыта большим количеством воды.
- Некоторые реагенты содержат ProClin 300 (0,04%; 0,1% и/или 0,5%) который может вызывать раздражение кожи, слизистой оболочки глаз, дыхательных путей.



X Irritant

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

Качество результатов зависит от соблюдения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики:

- Название теста и порядковый номер находятся на рамке каждого планшета, тот же номер указан на каждом стрипе.
- Genetic Systems™ HIV-1 Ag EIA : Идентификационный номер = 49**
- 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 изменяйте процедуру проведения теста.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Не используйте при постановке теста реагенты различных 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 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.

- Перед началом исследования выдержите реагенты в течение 30 минут при комнатной температуре (18-30 °C).
- Не проводите тестирование в присутствии испарений реагентов, содержащих кислоты, щелочи, альдегиды, или при повышенной запыленности. Эти факторы способны повлиять на ферментативную активность конъюгата.
- Используйте одноразовую лабораторную посуду, или, в крайнем случае, тщательно промытую и ополоснутую деионизированной водой.
- Не допускайте высыхания микропланшета в интервале между окончанием промывки и внесением реагентов.
- Для каждого образца используйте новые одноразовые наконечники.
- Регулярно проверяйте точность и правильность работы пипеток и используемого оборудования.
- Промывка: для достижения наилучших характеристик теста точно следуйте описанной в инструкции процедуре промывки.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость для разведения конъюгата и рабочей смеси TMB.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к металлам и их ионам. Не допускайте контакта металлических предметов с растворами, содержащими конъюгат или субстрат.
- Рабочая смесь (буфер субстрата + хромоген) должна приобрести розовое окрашивание. Изменение розового окрашивания в течение нескольких минут после приготовления смеси означает, что реагент не подлежит использованию и должен быть заменен.
- Рабочая смесь субстратного раствора должна готовиться в чистой одноразовой пластиковой или стеклянной емкости, предварительно промытой 1N HCl, тщательно ополоснутой дистиллированной водой и высушенной. Этот реагент должен храниться в темном месте.

7. СБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Пробы крови должны отбираться в соответствии с общепринятыми правилами. Набор предназначен для тестирования сывороток, плазмы или клеточной культуры. Проверялись следующие антикоагулянты: ЭДТА, гепарин, цитрат натрия, CPDA-1 и ACD, все они были найдены приемлемыми. При заборе крови в пробирки с антикоагулянтом необходимо убедиться в правильном заборе требуемого объема (до указанной метки) во избежание неправильного разведения.

Во избежание гемолиза отделите сыворотку или плазму от сгустка или эритроцитов как можно скоро после забора пробы. Значительный гемолиз может повлиять на результаты исследования. Агрегированные пробы должны быть центрифугированы до начала тестирования. Наличие взвеси агрегатов фибрина может являться

причиной ложноположительных результатов. Образцы культуры клеток, которые требуют разведения, перед тестированием могут быть разведены в идентичной среде, что использовалась при культивировании.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ТЕРМИЧЕСКИ ИНАКТИВИРОВАННЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Храните пробы при температуре от +2 до +8 °С, если исследование планируется провести в течение 7 дней. В ином случае рекомендуется глубокая заморозка до -20 °С. Плазма должна быть быстро разморожена нагреванием в течении нескольких минут в водяной бане при 40 °С (во избежание преципитации фибрина). В связи с нестабильностью ВИЧ-1 антигена температура не должна превышать 40 °С. Нельзя использовать пробы, которые были заморожены и разморожены более 3 раз.

При транспортировке пробы должны быть упакованы в соответствии с действующими правилами перевозки потенциально инфекционных агентов.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННУЮ, ГИПЕРЛИПИДЕМИЧЕСКУЮ ИЛИ СИЛЬНО ГЕМОЛИЗИРОВАННУЮ СЫВОРОТКУ ИЛИ ПЛАЗМУ.

ПРИМЕЧАНИЕ.

Образцы, содержащие до 80 мг/л билирубина, до 36 г/л, иммуноглобулинов IgM или IgG, липемические образцы, содержащие в эквиваленте до 5 г/л липидов, и гемолизированные образцы с содержанием гемоглобина до 5 г/л могут быть использованы в исследовании. Указанное содержание примесей не оказывает влияния на правильность результата.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Примечание: перед началом исследования реагенты тест-системы, за исключением концентрированных конъюгатов 1 и 2 (R4 и R5), выдержите в течение 30 минут при комнатной температуре при +18 до +30 °С.

Реагенты, готовые к использованию

Реагент R1: Микропланшет

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. Не использованные стрипы положите в пакет, запечатайте и храните при +2 – 8 °С.

Реагент R3: Раствор для разведения образцов

Реагент CO: Контрольный отрицательный образец

Реагент C1: Контрольный положительный образец

Реагент R10: СТОП-раствор

Реагенты, требующие приготовления перед использованием

Промывочный раствор (x20) (R2)

Разведите концентрат промывающего раствора R2 дистиллированной водой в соотношении 1:20. Перемешайте. Для промывки 12 стрипов достаточно 800 мл промывочного раствора в рабочей концентрации.

Примечание: Концентрат промывающего раствора ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС ИФА (x 30), который входит в состав других наборов линии ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС, также может быть использован для постановки данного теста. В этом случае разведите 1 часть концентрата в 29 частях воды.

Рабочий Раствор Конъюгата 1 (R4+R6) и Рабочий Раствор Конъюгата 2 (R5+R6)

Конъюгат 1 (R4) и Конъюгат 2 (R5) поставляются в виде концентратов x100. Для приготовления рабочих растворов Конъюгата 1 и Конъюгата 2 необходимо их

развести в соотношении 1:101 в растворе для разведения конъюгатов (R6). Используйте чистую стеклянную или одноразовую пластиковую посуду. Запишите номер серии Концентрата Конъюгата, дату и время приготовления, срок годности (24 часа с момента приготовления) на флаконе. Перед использованием тщательно перемешайте реагент.

После перемешивания цвет Рабочего Раствора Конъюгата 1 – желтый, а Рабочего Раствора Конъюгата 2 – зеленый.

Схема приготовления Рабочих Растворов Конъюгатов 1 и 2													
Количество стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12*	24*
Количество Концентрата Конъюгата (мкл)	20	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	240
Количество раствора для разведения конъюгата (мл)	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	24

* - один полный планшет, ** - два полных планшета

Рабочий Субстратный Раствор ТМБ

Разведите хромоген (R9) в субстратном буфере (R8) в соотношении 1:11 (например, 1 мл реагента R9 + 10 мл реагента R8). 10 мл готового раствора достаточно для работы от 1 до 12 стрипов. Тщательно перемешайте.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ – СРОКИ ГОДНОСТИ

Храните набор при температуре от +2 до +8 °C. Все реагенты, содержащиеся в наборе «Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА», могут быть использованы после вскрытия до срока годности, указанного на наборе, за следующим исключением:

R1: После вскрытия пакета со стрипами, в условиях хранения в интервале температур от +2 до +8 °C в плотно закрытом пакете, их можно использовать 1 месяц

R2: Разведенный промывочный раствор при хранении от +2 до +30 °C может быть использован в течение 14 дней. Концентрат промывочного раствора (R2) может храниться при +2 - 30 °C

R8-R9: После приготовления, реагент может быть использован в течение 6 часов в условиях хранения при комнатной температуре (от +18 до +30 °C) в темном месте.

R4-R5: После приготовления, рабочие растворы конъюгатов могут быть использованы в течении 24 часов в условиях хранения при комнатной температуре (от +18 до +30 °C).

10. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕСТА

Ниже приведены 2 возможных протокола анализа для определения ВИЧ-1 p-24 антигена в сыворотке или плазме крови человека и в образцах культуры клеток:

Тип определения	Инкубация образцов	Инкубация с Конъюгатом 1	Инкубация с Конъюгатом 2	Развитие окраски
37 °С инкубация	Статическая инкубация 37±1°С, сухой воздух, 60±5 мин	Статическая инкубация 37±1°С, сухой воздух, 30±5 мин	Статическая инкубация 37±1°С, сухой воздух, 30±5 мин	Статическая инкубация 18-30° С, в темноте, 30±5 мин
40 °С инкубация	Статическая инкубация 40±1°С, сухой воздух, 60±5 мин	Статическая инкубация 40±1°С, сухой воздух, 30±5 мин	Статическая инкубация 37±1°С, сухой воздух, 30±5 мин	Статическая инкубация 18-30° С, в темноте, 30±5 мин

Для образцов, первично исследованных при 37° С или при 40° С, все повторные тестирования, включая подтверждение результатов, должны проводиться по тому же протоколу.

Приблизительное время выполнения анализа - 3.5 – 4 часа от начала первой инкубации. Весь анализ должен выполняться без перерывов от начала до конца.

При каждой постановке должны использоваться два Положительных и три Отрицательных Контрольных образца на планшет. Если в качестве образцов исследуется культура клеток, вместо отрицательного контрольного образца из набора используются три отрицательных образца культуральной среды. Величина контрольного уровня (cut-off) определяется для каждого планшета индивидуально. Защищайте планшет от попадания яркого света во время последней инкубации (после внесения Рабочего Раствора ТМБ).

Строго следуйте предлагаемой процедуре выполнения теста и соблюдайте Правила Хорошей Лабораторной Практики.

1. Составьте план внесения и идентификации образцов.
2. Приготовьте промывающий раствор.
3. Возьмите рамку и установите в нее необходимое количество стрипов.
4. Без предварительного промывания внесите реагенты в следующей последовательности:

- 4.1 По 50 мкл Раствора для разведения образцов в каждую лунку
- 4.2 По 150 мкл отрицательного контрольного образца в лунки A1-B1-C1
- 4.3 По 150 мкл положительного контрольного образца в лунки D1-E1
- 4.4 По 150 мкл исследуемых образцов в лунки G1 и т.д. ...

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

Если в качестве образцов тестируется культура клеток, вместо отрицательного контрольного образца из набора используется три отрицательных образца культуральной среды. Тщательно перемешайте раствор для разведения образцов с внесенными образцами.

Примечание: на этом этапе внесение образцов в каждую лунку может контролироваться визуально: при внесении образцов или контролей в лунки раствор для разведения образцов меняет свой цвет с зеленого на синий. После тщательного перемешивания содержимое каждой лунки становится однородно окрашенным.

Образцы культуры клеток могут не изменять окраску. Все зависит от используемой культуральной среды (см. так же п. 12 для автоматического контроля дозирования образцов и реагентов: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ).

5. Накройте планшет самоклеющейся пленкой. Плотно прижмите ее по всей площади планшета и убедитесь в плотном ее прилегании.
6. Инкубируйте планшет в течение 60 ± 5 мин при $37 \pm 1^\circ \text{C}$ или при $40 \pm 1^\circ \text{C}$ в неподвижном суховоздушном инкубаторе.
7. После окончания инкубации осторожно удалите самоклеющуюся пленку и удалите содержимое всех лунок в контейнер для контаминированных отходов (содержащий гипохлорит натрия). Внесите в лунки как минимум 0,370 мл промывающего раствора. Оставьте лунки планшета в контакте с промывающим раствором на 20-60 сек. Удалите промывающий раствор. Повторите всю процедуру еще 4 раза (т.е. всего должно быть 5 циклов промывки). Остаточный объем не должен превышать 10 мкл (если необходимо, подсушите планшет, перевернув на чистую фильтровальную бумагу). При использовании автоматического промывателя следуйте такой же процедуре (см. п. 10: РЕКОМЕНДАЦИИ).
8. Быстро внесите по 100 мкл Рабочего Раствора Конъюгата 1 во все лунки, содержащие образцы и контроли, предварительно перемешав его, избегая сильного встряхивания.
Примечание: внесение рабочего раствора конъюгата может контролироваться визуально – он окрашен желтым цветом.
9. Накройте планшет самоклеющейся пленкой или используйте другие способы герметизации для уменьшения испарения. Инкубируйте планшет в течение 30 ± 5 мин при $37 \pm 1^\circ \text{C}$ или при $40 \pm 1^\circ \text{C}$ в неподвижном суховоздушном инкубаторе.
10. После окончания инкубации осторожно снимите самоклеющуюся пленку с поверхности микропланшета и удалите содержимое всех лунок в контейнер для контаминированных отходов (содержащий гипохлорит натрия). Внесите в лунки как минимум 0,370 мл промывающего раствора. Оставьте лунки планшета в контакте с промывающим раствором на 20-60 сек. Удалите промывающий раствор. Повторите всю процедуру еще 4 раза (т.е. всего должно быть 5 циклов промывки). Остаточный объем не должен превышать 10 мкл (если необходимо, подсушите планшет, перевернув на чистую фильтровальную бумагу).
11. Быстро внесите по 100 мкл Рабочего Раствора Конъюгата 2 во все лунки, содержащие образцы и контроли, предварительно перемешав его, избегая сильного встряхивания.
Примечание: внесение рабочего раствора конъюгата может контролироваться визуально – он окрашен зеленым цветом.
12. Накройте планшет липкой пленкой или используйте другие способы для уменьшения испарения. Инкубируйте планшет в течение 30 ± 5 мин при $37 \pm 1^\circ \text{C}$ или при $40 \pm 1^\circ \text{C}$ в статическом суховоздушном инкубаторе.
13. После окончания инкубации осторожно снимите самоклеющуюся пленку с поверхности микропланшета и удалите содержимое всех лунок и промойте 5 раз, как было описано выше. Остаточный объем не должен превышать 10 мкл (если необходимо, подсушите планшет, перевернув его на чистую фильтровальную бумагу).
14. Внесите по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора ТМБ (R8+R9) во все лунки, содержащие образцы и контроли. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре ($18-30^\circ \text{C}$) в течение 30 ± 5 мин. На этом этапе не используйте самоклеющуюся пленку.
Примечание: внесение субстратного раствора может контролироваться визуально – он окрашен розовым цветом. Есть четкая разница между пустыми лунками и лунками с розовым субстратным раствором (см. так же п. 12 для автоматического контроля дозирования образцов и реагентов: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ).
15. Внесите по 100 мкл СТОП-РЕАГЕНТА (R10), используя ту же самую последовательность и скорость внесения, как и при раскапывании субстратного

раствора. Осторожно встряхните планшет для полного перемешивания.

Примечание: внесение Стоп-реагента, который является бесцветным, может контролироваться визуально: после его внесения розовый субстратный раствор меняет свой цвет. Отрицательные образцы обесцвечиваются, положительные образцы переходят от синего к желтому окрашиванию

16. Аккуратно протрите дно микропланшета. И, как минимум, через 4 мин, но не позднее, чем через 30 мин после остановки реакции считайте результаты на спектрофотометре для микропланшетов, используя длины волн 450нм/620-700 нм.
17. Проверьте, согласуются ли зарегистрированные результаты с планом распределения контролей и образцов

11 ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Оценка правильности проведения теста (валидация)

Постановка считается правильно проведенной, если выполняются следующие критерии:

- Отдельные значения оптической плотности (ОП) Отрицательных Контрольных образцов должны находиться в интервале от 0.000 до 0.100 оптических единиц (ОЕ). Одно значение оптической плотности Отрицательного Контрольного образца можно исключить из расчетов, если оно выходит за пределы данного интервала, тогда среднее значение оптической плотности Отрицательных Контрольных образцов может быть рассчитано из двух оставшихся значений. Если оптическая плотность 2-х или более Отрицательных Контрольных образцов не удовлетворяет заданным критериям, исследование считается недостоверным и должно быть проведено повторно.
- Среднее значение оптической плотности Положительных Контрольных образцов должно быть не меньше 0,500 ОЕ, а отдельные значения оптической плотности Положительных Контрольных образцов не должны отличаться от среднего значения Положительного Контрольного образца более чем на 35%. Ни одно значение оптической плотности Положительного Контрольного образца не может быть исключено из расчетов.

2. Вычисление средних значений оптической плотности.

Средние значения оптической плотности валидованных Отрицательных и Положительных Контрольных образцов определяются делением суммы значений их оптических плотностей на число контролей, удовлетворяющих заданным условиям.

3. Критическое значение оптической плотности.

Критическое значение оптической плотности (Cut-off) рассчитывается путем прибавления 0.070 к среднему значению оптической плотности Отрицательного контрольного образца (ОК):

Пример: Среднее значение ОК=0.033

$\text{Cut-off} = 0.070 + 0.033 = 0.103$

4. Интерпретация результатов.

Наличие или отсутствие ВИЧ-1 антигена определяется путем сравнения оптической плотности образца и величины критического значения оптической плотности (Cut-off).

Образцы с оптической плотностью меньше 0.000 должны быть протестированы повторно. Образцы с оптической плотностью большей, чем верхний линейный предел спектрофотометра, должны учитываться как реактивные.

Образцы с оптической плотностью ниже контрольного уровня (cut-off) должны учитываться как нереактивные в тест-системе «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА» и могут считаться отрицательными по ВИЧ-1 антигену. Дальнейшее тестирование не требуется.

Образцы с оптической плотностью не ниже контрольного уровня (cut-off) должны учитываться как первично реактивные в тест-системе «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА». Первично реактивные образцы должны быть протестированы повторно в дублях для подтверждения первичного результата. Если, после повторного тестирования, оптическая плотность образца в обеих лунках ниже критической величины оптической плотности (cut-off), первоначальный образец может быть учтен как повторно нереактивный и отрицательный по ВИЧ-1 антигену. Факторы, чаще всего являющиеся причиной отсутствия реактивности образцов при повторном тестировании в дублях:

- Недостаточная промывка лунок микропланшета
- Перекрестная контаминация нереактивных образцов образцами, содержащими высокий титр ВИЧ-1 антигена
- Контаминация Рабочего Раствора ТМБ агентами, обладающими окислительными свойствами (хлорсодержащие вещества, ионы металлов, перекись водорода и т.д.)
- Контаминация СТОП-реагента.

Если, после повторного тестирования, оптическая плотность хотя бы одного из дублей оказалась больше или равной критической величине (cut-off), образец должен быть учтен как повторно реактивный в тест-системе «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА» с учетом ограничений, указанных ниже. Образец, который является повторно реактивным в тест-системе «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА», должен быть подтвержден в тесте «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ Подтверждающий» (кат. номер 71121). Образец может считаться положительным по ВИЧ-1 антигену, только если ВИЧ-1 антиген может быть нейтрализован в подтверждающей процедуре.

12. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Спектрофотометрическая верификация внесения образца

После внесения раствора для разведения образцов (R3) и образцов, можно проверить внесение образцов в лунки спектрофотометрическим измерением оптической плотности содержимого лунок микропланшета при длине волны 620 нм: оптическая плотность лунки с образцом должна быть больше, чем 0.250 (меньшая оптическая плотность свидетельствует о недостаточном внесении образца).

Примечание: образцы клеточной культуры могут не изменять цвет, это зависит от вида используемой культуральной среды. В таких случаях не используйте автоматическую верификацию.

Спектрофотометрическая верификация процесса раскапывания субстратного раствора

Можно также проверить наличие розового субстратного раствора в лунках с помощью автоматической регистрации оптической плотности содержимого лунок микропланшета при длине волны 490 нм: лунки с розовым субстратным раствором должны иметь оптическую плотность не ниже 0.100 (меньшая оптическая плотность свидетельствует о недостаточном внесении субстратного раствора).

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Чувствительность

- 138 пациентов, инфицированных ВИЧ и имеющих различные стадии развития инфекции (СПИД, острая инфекция и т.д.), были исследованы и показали в тесте «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА» положительные результаты.
- были оттестированы 20 тщательно исследованных и документированных сероконверсионных панелей. Полученные результаты сопоставимы с данными других тестов для выявления ВИЧ 1 антигена.
- 55 образцов супернатанта клеточной культуры ВИЧ-1 (53 группы М и 2 группы О), а также панель серийных разведений антигенного стандарта «Ag VIH SFTS 96» получили при исследовании с помощью теста «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА» положительные результаты (кроме 2 разведений образца, содержащего АГ вируса группы О)
 - 53 образца супернатанта клеточной культуры ВИЧ-1 группы М включают в себя следующие генотипы: 10 образцов – генотип А, 10 – В, 9 – С, 5 – D, 11 – Е, 2 – F, 2 – G, 1 – H, 2 – J, и 1 – N.
 - Панель «Ag VIH SFTS 96» включает следующие генотипы: А, В, С, D, Е, F, G, H генотипы группы М и 1 группы О.

Аналитическая чувствительность

Предел чувствительности теста был оценен на серии разведений, приготовленных из французского национального стандарта (очищенный вирусный лизат генотипа В, разведенный в негативной цитратной плазме) и BBI – панели (PRA 801). Предел чувствительности оценивается в 8 пкг/мл ВИЧ антигена при любом протоколе исследования.

Калибровочная кривая, полученная с использованием ВИЧ-1 антигенного стандарта (кат. номер 72217) линейна в пределах между 0 и 100 пкг/мл.

Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность оценивалась в исследованиях:

- 4038 доноров крови и составила 99.95%
- 209 клинических пациентов и составила 100%

Была исследована панель, содержащая 105 образцов сыворотки пациентов:

- включающих антитела к ВГА, ВГС, вирусу Т-клеточного лейкоза, ВПГ, вирусу Эпштейна-Барра, краснухи, *Toxoplasma Gondii*, сифилиса, ЦМВ.
- включающих аутоиммунные антитела, IgG, IgM против ревматоидного фактора
- образцы крови беременных женщин, пациентов с циррозом печени, многократным переливанием крови и пациентов с системной красной волчанкой.

Только один образец, взятый у пациента с системной красной волчанкой, оказался в тесте «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА» положительным, но при исследовании в подтверждающем тесте был получен отрицательный результат.

Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов в одной постановке была оценена на 3-х положительных и одном отрицательном образцах в 30-и повторях.

Воспроизводимость результатов, полученных в разных постановках, оценивалась на

3-х положительных и одном отрицательном образцах в течение 5 дней двумя разными лаборантами.

Коэффициент вариации для положительных образцов был меньше 10%

14. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА.

- Описанные в инструкции «Дженетик Системс ВИЧ - 1 АГ ИФА» Процедура выполнения анализа и Интерпретация результатов должны строго соблюдаться при тестировании антигена ВИЧ-1 (p24) в сыворотке, плазме крови человека и супернатанте клеточной культуры. Пользователю этого набора необходимо внимательно ознакомиться с инструкцией-вкладышем перед проведением теста. В частности, при анализе необходимо четко соблюдать требования по внесению образцов и реагентов, промывки планшета и продолжительности этапов инкубации.
- Подтверждение присутствия ВИЧ-1 антигена не должно быть основано на единственном результате единичного теста. Для определения специфичности результата для любого образца, выявленного при скрининге, требуются дополнительные тесты, например, подтверждающие.
- Во всех высокочувствительных иммунологических методах существует возможность появления неопределенных реакций, которые могут привести к ложноположительным результатам. Количество ложноположительных результатов зависит от чувствительности и специфичности конкретного набора.
- Отрицательные результаты могут наблюдаться, если количество данного маркера в образце слишком мало для пределов чувствительности теста, или, если маркер не присутствует на стадии заболевания, во время которой был взят образец.
- Изменчивость ВИЧ вируса не позволяет исключить возможность появления ложноотрицательных результатов.
Ни один известный тест не может обеспечить полную гарантию отсутствия вируса ВИЧ.
- Ошибки при внесении образцов (пропущенный образец) или реагентов (т.е. нарушение инструкции) может привести к ложноотрицательному результату. В случае клинических показаний или подозрения в процедурной ошибке следует повторить тест.
- Значение коэффициента поглощения (оптической плотности) содержимого лунок микропланшета менее 0.000 ОП указывает на ошибку выполнения процедуры или ошибку прибора. Измерение следует повторить.
- Факторы, которые могут повлиять на критерии валидности (см. раздел Оценка правильности проведения теста): ошибки (пропуск) при внесении образцов или реагентов в лунки микропланшета, недостаточная промывка планшета, несоблюдение времени и температуры инкубации, добавление в лунку неправильных реагентов, присутствие металлов, или попадание в лунки гипохлорита натрия.
- В тесте не исследовались образцы трупных тканей или образцы других биологических жидкостей, кроме сыворотки, плазмы или образцов клеточной культуры.
- Образцы клеточной культуры могут при внесении их в лунки микропланшета не

менять цвет, что зависит от вида используемой культуральной среды.

- Оценка аналитической чувствительности теста (8 пг/мл), полученная при испытаниях, может варьировать в зависимости от условий постановки или из-за вариабельности между партиями. Био-Рад гарантирует аналитическую чувствительность ниже 15 пг/мл.
- 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.

15. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

См. французскую версию.

Крепленое и
прошито
наизнанку
Автомат



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»

Бобровник Е.В.

2008 г.



**Инструкция по применению изделия
медицинского назначения тест-системы для
диагностики in vitro ВИЧ-1 комплекта «
Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ
Подтверждающий» (Genetic Systems HIV-1 Ag
CONFIRMATORY ASSAY)**

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Образцы, повторно реактивные в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА", должны быть протестированы для подтверждения наличия ВИЧ-1 (p24) антигена. Нейтрализация вирусного антигена с помощью анти-ВИЧ антител – обще-принятый метод подтверждения. На присутствие p24 антигена в образце указывает снижение реактивности по ВИЧ-1 антигену образца, обработанного нейтрализующим агентом, по сравнению с тем же самым образцом, который не был обработан нейтрализующим агентом.

"Дженетик Системс ВИЧ-1 Аг – подтверждающий" – тест-система, предна-значенная для подтверждения наличия p24 антигена вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) в образцах сыворотки, плазмы крови человека и супернатанта клеточной культуры, которые

являлись повторно реактивными в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА".

2. ПРИНЦИП

Повторно реактивный образец инкубируется с ВИЧ-1 Антиген Подтверждающим Реагентом (человеческие антитела к ВИЧ-антигену). Если ВИЧ-1 антиген присутствует в образце, он будет нейтрализован ВИЧ-1 Антиген Подтверждающим Реагентом. Затем обработанный образец повторно тестируется с помощью тест-системы "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА". Нейтрализованный ВИЧ-1 антиген не может связываться с анти-ВИЧ-1 антителами, фиксированными на лунках микропланшета, что приводит к снижению оптической плотности. Для сравнения оптической плотности параллельно с нейтрализованным образцом исследуется необработанный нейтрализующим агентом образец (образец, обработанный ВИЧ-1 Антиген Отрицательным Контролем вместо ВИЧ-1 Антиген Подтверждающего Реагента). Повторно реактивные образцы в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" подтверждаются как положительные в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий", если выполняются следующие условия: (1) оптическая плотность в нейтрализованных образцах меньше на 50% и более, чем оптическая плотность образцов, необработанных нейтрализующим агентом; (2) оптическая плотность необработанных образцов должна быть выше уровня среза (Cut-off).

3. Состав комплекта «Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ Подтверждающий»

Этикетка	Описание реагента	Фасовка
РА	ВИЧ-1 антиген Подтверждающий Реагент Человеческая сыворотка, содержащая антитела к ВИЧ-1. 0,005% Гентамицин сульфат. Консервант – 0,5% Проклин – 300	1 флакон, 1,3 мл
СО	Отрицательный Контроль Сыворотка крови человека, не содержащая маркеры ВИЧ-1 и ВИЧ-2, Гепатитов В и С, HTLV 1 и HTLV 2. 0,005% Гентамицин. Консервант – 0,5% Проклин – 300	1 флакон, 12 мл

4. НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

См. соответствующий раздел инструкции к тест-системе "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (каталожный номер 71120).

5. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Только для диагностики in vitro.

- ВИЧ-1 Антиген Подтверждающий Реагент при тестировании не содержал маркеры к HBsAg, антителам к ВГС и вирусу Т-клеточного лейкоза 1. Подтверждающий Реагент инактивирован нагреванием.
- Человеческий материал, использованный для приготовления отрицательного контрольного образца, при тестировании не содержал маркеры антигена ВИЧ-1, HBs антигена, антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, ВГС и к вирусу Т-клеточного лейкоза 1 и 2 типа.
- Ни один метод детекции не может гарантировать отсутствие или наличие инфекционных агентов в исследуемых образцах и реагентах человеческого происхождения. Их следует рассматривать как потенциально контаминированные и работать с соответствующими мерами предосторожности.
- Некоторые реагенты содержат раздражающее вещество 0,5% ProClin™ 300, которое может вызывать раздражение кожных и слизистых покровов.



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.

- Пробы и реагенты человеческого происхождения, а также контаминированные вещества и продукты должны выбрасываться только после дезинфекции следующими способами:
 - замачивание в растворе гипохлорита натрия конечной концентрации 5% (в объемном соотношении 1 часть дезинфицирующего вещества на 10 частей обеззараживаемой жидкости или воды) в течение 30 минут,
 - автоклавирование при 121°C в течение не менее 2 часов. Автоклавирование является лучшим способом инактивирования ВГВ и ВИЧ

ВНИМАНИЕ: НЕ ПОДВЕРГАЙТЕ АВТОКЛАВИРОВАНИЮ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИТ НАТРИЯ.

- См. соответствующий раздел инструкции к тест-системе "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120).

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Качество результатов зависит от соблюдения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики:

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не изменяйте процедуру проведения теста
- Не используйте при постановке теста реагенты различных серий

- Перед началом использования выдержите реагенты в течение 30 минут при комнатной температуре (18- 30°C).
- См. соответствующий раздел инструкции к тесту "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120).

7. СБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Пробы крови должны забираться в соответствии с общепринятыми правилами. Набор предназначен для тестирования сывороток, плазмы или клеточной культуры.

Проверялись следующие антикоагулянты: ЭДТА, гепарин, цитрат натрия, все они были найдены приемлемыми.

См. соответствующий раздел инструкции к тесту "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120).

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ. ХРАНЕНИЕ. СРОК ГОДНОСТИ

Реагенты теста "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий" готовы к употреблению. Температура хранения тест-системы 2-8°C. Перед началом использования выдержите все реагенты тест-системы при комнатной температуре (+18 до +30°C). Все реагенты, входящие в состав набора "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий", могут использоваться после вскрытия до конца срока годности, указанной на упаковке.

9. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕСТА

Приблизительное время выполнения анализа 4 часа. Весь анализ должен выполняться без перерывов от начала до конца.

ВНИМАНИЕ: Для образцов, повторно реактивных в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА" и тестированных при 37°C, процедура подтверждения в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий" должна тоже проводиться при 37°C. Для образцов, повторно реактивных в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА" и тестированных при 40°C, процедура подтверждения в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий" должна проводиться при 40°C.

Строго следуйте предлагаемой процедуре выполнения теста.

При каждой постановке следует использовать Положительный и Отрицательный Контрольный образец.

Соблюдайте Правила Хорошей Лабораторной Практики.

1. Составьте план внесения и идентификации образцов.
2. Приготовьте промывающий раствор.
3. Возьмите рамку и установите в нее необходимое количество стрипов R1.
4. Процедура нейтрализации:
 - а) Для каждого образца подпишите одну пластиковую пробирку "А" (нейтрализованные) и одну пластиковую пробирку "В" (не нейтрализованные). Внесите по 150 мкл повторно реактивного образца в каждую пробирку.

- b) Для ВИЧ-1 Антиген Положительного Контроля подпишите две пластиковые пробирки "А" (нейтрализованные) и две пластиковые пробирки "В" (не нейтрализованные). Внесите по 150 мкл ВИЧ-1 Антиген Положительного Контроля (С1) в каждую пробирку.
 - c) Для ВИЧ-1 Антиген Отрицательного Контроля подпишите три пластиковые пробирки "В" (не нейтрализованные). Внесите по 150 мкл ВИЧ-1 Антиген Отрицательного Контроля (СО) в каждую пробирку.
 - d) В каждую пробирку помеченную "А" (нейтрализованные) внесите по 25 мкл ВИЧ-1 Антиген Подтверждающего Реагента.
 - e) В каждую пробирку помеченную "В" (не нейтрализованные) внесите по 25 мкл ВИЧ-1 Антиген Отрицательного Контроля (СО).
 - f) Осторожно встряхните пробирки либо с использованием вортекса, либо постукиванием по стенке пробирки. Избегайте пенообразования.
 - g) Для проведения реакции нейтрализации инкубируйте пробирки в течение 15-30 минут при комнатной температуре (+18 до +30°C).
5. Без предварительного промывания микропланшета внесите реагенты в следующей последовательности:
- 5.1 По 50 мкл Раствора для разведения образцов в каждую лунку
 - 5.2 По 150 мкл отрицательного контрольного образца (СО) в лунки А1-В1-С1
 - 5.3 По 150 мкл нейтрализованного положительного контрольного образца (С1) в лунки D1, E1
 - 5.4 По 150 мкл не нейтрализованного положительного контрольного образца (С1) в лунки F1, G1
 - 5.5 По 150 мкл тестируемых образцов в лунки H1 и т.д.

Четыре положительных контрольных образца, два нейтрализованных и два не подвергавшихся нейтрализации, а также три отрицательных контрольных образца должны быть использованы при каждом тестировании любого количества образцов (в объеме целого планшета или его части).

Удостоверьтесь, что раствор для разведения образцов хорошо перемешан с образцами и контролями. При тщательном перемешивании содержимое каждой лунки имеет однородный цвет.

Примечание: на этом этапе внесение образцов в каждую лунку может контролироваться визуально: при внесении образцов или контролей в лунки раствор для разведения образцов меняет свой цвет с зеленого на синий. После тщательного перемешивания содержимое каждой лунки становится однородно окрашенным. Образцы культуры клеток могут не изменять окраску, все зависит от используемой культуральной среды (см. так же п. 11 для автоматического контроля дозирования образцов и реагентов: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ).

- 6. Если возможно, накройте планшет самоклеющейся пленкой. Плотно прижмите ее по всей поверхности планшета и убедитесь в плотном ее прилегании.

7. Инкубируйте планшет в течение 30 ± 5 мин при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ или при $40 \pm 1^\circ\text{C}$ в неподвижном суховоздушном инкубаторе.
8. После окончания инкубации осторожно снимите самоклеющуюся пленку и удалите содержимое всех лунок в контейнер для контаминированных отходов (содержащий гипохлорит натрия). Внесите в лунки как минимум 0,370 мл промывающего раствора. Оставьте лунки планшета в контакте с промывающим раствором на 20-60 сек. Удалите промывающий раствор. Повторите всю процедуру еще 4 раза (т.е. всего должно быть минимум 5 циклов промывки). Остаточный объем не должен превышать 10 мкл (если необходимо, подсушите планшет, перевернув его на чистую фильтровальную бумагу). При использовании автоматического промывателя следуйте аналогичной процедуре.
9. Быстро внесите по 100 мкл Рабочего Раствора Конъюгата 1 во все лунки, содержащие образцы и контроли, предварительно перемешав его, избегая сильного встряхивания.

Примечание: внесение рабочего раствора конъюгата может контролироваться визуально – он окрашен желтым цветом.

10. Накройте планшет самоклеющейся пленкой или используйте другие способы герметизации для уменьшения испарения. Инкубируйте планшет в течение 30 ± 5 мин при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ или при $40 \pm 1^\circ\text{C}$ в неподвижном суховоздушном инкубаторе.
11. После окончания инкубации осторожно снимите самоклеющуюся пленку и удалите содержимое всех лунок. Промойте 5 раз, как было описано выше. При использовании автоматического промывателя следуйте такой же процедуре.
12. Быстро внесите по 100 мкл Рабочего Раствора Конъюгата 2 во все лунки, содержащие образцы и контроли, предварительно аккуратно перемешав его.

Примечание: внесение рабочего раствора конъюгата может контролироваться визуально – он окрашен зеленым цветом.

13. Накройте планшет самоклеющейся пленкой. Инкубируйте планшет в течение 30 ± 5 мин при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ или при $40 \pm 1^\circ\text{C}$ в неподвижном суховоздушном инкубаторе.
14. После окончания инкубации осторожно снимите самоклеющуюся пленку и удалите содержимое всех лунок и промойте 5 раз, как было описано выше. Остаточный объем не должен превышать 10 мкл (если необходимо, подсушите планшет, перевернув его на чистую фильтровальную бумагу).
15. Внесите по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора ТМБ (R8+R9) во все лунки, содержащие образцы и контроли. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре ($18-30^\circ\text{C}$) в течение 30 ± 5 мин. На этом этапе не используйте самоклеющуюся пленку.

Примечание: внесение субстратного раствора может контролироваться визуально – он окрашен розовым цветом. Есть четкая разница между пустыми лунками и лунками с розовым субстратным раствором (см. так же раздел 11 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ).

16. Внесите по 100 мкл СТОП-РЕАГЕНТА (R10), используя ту же самую последовательность и скорость внесения, как и при раскалывании субстратного раствора. Осторожно встряхните планшет для полного перемешивания.

Примечание: внесение Стоп-реагента, который является бесцветным, может контролироваться визуально: после его внесения розовый субстратный раствор меняет свой цвет. Отрицательные образцы обесцвечиваются, положительные образцы переходят от синего к желтому окрашиванию.

17. Аккуратно протрите дно микропланшета. И, как минимум, через 4 мин, но не позднее, чем через 30 мин после остановки реакции считайте результаты на спектрофотометре для микропланшет, используя длины волн 450 нм/620-700 нм.
18. Проверьте, согласуются ли регистрируемые результаты с планом распределения контролей и образцов

10. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие ВИЧ-1 антигена определяется путем сравнения значений оптической плотности нейтрализованных образцов и значений оптической плотности не нейтрализованных образцов. Это соотношение выражается в показателе нейтрализации (в %).

1) Оценка правильности проведения теста по оптической плотности Отрицательного и Положительного Контрольного Образца.

См. соответствующий раздел инструкции к тесту "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120). Одно значение Отрицательного Контрольного Образца может быть удалено из расчетов, если его значение вне приемлемого диапазона валидации, описанного в инструкции "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА".

Ни одно значение Положительного Контрольного образца не может быть удалено из расчетов.

2) Вычисление средних значений оптической плотности.

Средние значения оптической плотности Отрицательных и Положительных Контрольных Образцов (как нейтрализованных, так и не нейтрализованных) определяются делением суммы значений их оптических плотностей на число поставленных и достоверных контролей.

Критерии расчета средних значений оптической плотности см. в соответствующем разделе инструкции к тесту "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120).

3) Вычисление показателя нейтрализации (в %)

Показатель нейтрализации определяется по следующей формуле:

$$\text{показатель нейтрализации} = 100 \times \frac{(\text{ОП не нейтрализованного образца} - \text{ОП нейтрализованного образца})}{(\text{ОП не нейтрализованного образца} - \text{ОП Отрицательного контроля})}$$

Пример:

Образец	Показатель нейтрализации
ВИЧ Антиген Отрицательный Контроль, Не нейтрализованный	0,045
ВИЧ Антиген Положительный Контроль, Не нейтрализованный	1,020
ВИЧ Антиген Положительный Контроль, Нейтрализованный	0,040

Показатель нейтрализации ВИЧ Антиген Положительного Контроля

$$100 \times \frac{1,020 - 0,040}{1,020 - 0,045} = \frac{0,980}{0,975} = 100,5\%$$

4) Оценка правильности проведения теста (валидация)

Постановка считается валидной, если соблюдаются следующие критерии:

- Отдельные значения оптической плотности (ОП) Отрицательных Контрольных образцов должны находиться в интервале от 0,000 до 0,100 оптических единиц (ОЕ). Одно значение оптической плотности Отрицательного Контрольного образца можно исключить из расчетов, если оно выходит за пределы данного интервала, тогда среднее значение оптической плотности Отрицательных Контрольных образцов может быть рассчитано из двух оставшихся значений. Если оптическая плотность 2-ух или более Отрицательных Контрольных образцов не удовлетворяет заданным критериям, исследование считается недостоверным и должно быть проведено повторно.
- Среднее значение оптической плотности Положительных Контрольных образцов должно быть не меньше 0,500 ОЕ, а отдельные значения оптической плотности Положительных Контрольных образцов должны попадать в диапазон от 0,65 до 1,35 от среднего значения Положительного Контрольного образца. Ни одно значение оптической плотности Положительного Контрольного образца не может быть исключено из расчетов.
- % показатель нейтрализации Положительного Контроля должен быть не меньше 50%.

5) Интерпретация результатов.

Образец считается положительным по ВИЧ-1 антигену, если выполняются следующие условия:

- Образец повторно реактивный в тест-системе "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА".
- Значение оптической плотности не нейтрализованного образца не ниже полученного значения уровня среза (cut-off).
- % нейтрализации ОП образца не меньше 50%.

Примечание: Если оптическая плотность образцов пациентов выше, чем верхний линейный предел ридера, используйте предельное значение ОП, регистрируемое ридером (2,999 ОЕ для ридера Bio-Rad Laboratories) как значение оптической плотности образца для дальнейших расчетов.

1. Вычислите значение уровня среза (cut-off) путем прибавления постоянной величины (0,050) к среднему значению оптической плотности отрицательного контроля.
2. Определите % показатель нейтрализации ОП образца с помощью формулы из раздела "Контроль Качества".

Пример расчетов и интерпретации результатов:

Образец	Оптическая плотность	Среднее значение
Отрицательный Контрольный Образец, не нейтрализованный	0,041	0,045
	0,050	
	0,045	
Положительный Контрольный Образец, не нейтрализованный	1,032	1,020
	1,008	
Положительный Контрольный Образец, нейтрализованный	0,037	0,040
	0,043	
Образец, не нейтрализованный	0,858	
Образец, нейтрализованный	0,041	

Уровень среза (cut-off) данного примера: $0,045 + 0,050 = 0,095$

Показатель нейтрализации Положительного Контрольного Образца

$$100 \times \frac{1,020 - 0,040}{1,020 - 0,045} = \frac{0,980}{0,975} = 100,5\%$$

Показатель нейтрализации образца

$$100 \times \frac{0,858 - 0,041}{0,858 - 0,045} = \frac{0,817}{0,813} = 100,5\%$$

Примечание: В некоторых случаях, образцы с высоким титром ВИЧ-1 антигена будут иметь показатель нейтрализации редукции ниже 50%. Поэтому, высоко реактивные образцы (с оптической плотностью не ниже 2,000) необходимо развести 1 : 4 или 1 : 8 ВИЧ-1 Антиген Отрицательным Контролем и исследовать повторно в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий". Если показатель нейтрализации для разведенного образца будет все еще меньше 50%, и образец остается высоко реактивным, необходимо еще раз развести образец 1 : 16 или больше ВИЧ-1 Антиген Отрицательным Контролем и исследовать повторно в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ – подтверждающий".

11. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

См. соответствующий раздел инструкции к тесту "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120).

12. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Специфичность

В тест-системе "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА" (кат. номер 71120) было исследовано 2063 образца доноров крови, среди них 941 образец сыворотки и 1122 образца плазмы. Для всех образцов результаты скрининга антител к ВИЧ были отрицательные, антиген ВИЧ не обнаружен во всех случаях.

Исследование специфичности было выполнено при двух температурах инкубации, указанных в инструкции. Два образца с ложно-положительными результатами не были нейтрализованы в подтверждающем тесте.

Чувствительность

Исследование чувствительности проводилось на 78 образцах (SFTS панель 96 и положительные образцы пациентов с разными стадиями заболевания ВИЧ-инфекции).

Все 76 образцов, положительные в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА", были подтверждены с помощью теста "Дженетик Системс ВИЧ-1 подтверждающий". Два образца пациента, отрицательные в другом ИФА-тесте, не были нейтрализованы подтверждающим тестом "Дженетик Системс ВИЧ-1 подтверждающий".

55 образцов супернатанта клеточных культур, включая разные группы и суб-типы ВИЧ1 АГ (A,B,C,D,E,F,G,H,J,N и O), были нейтрализованы.

Были исследованы 17 сероконверсионных панелей. Все образцы, реактивные в тесте "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА", были подтверждены с помощью теста "Дженетик Системс ВИЧ-1 подтверждающий".

Исследование "Hook эффекта" (подавления реакции при очень высоких концентрациях).

Для подтверждения отсутствия Hook-эффекта были исследованы высокие концентрации антигена ВИЧ 1 с помощью теста "Дженетик Системс ВИЧ-1 ИФА". Вирусный лизат ВИЧ-1 был разведен Раствором для разведения образцов до конечных концентраций от 2 мкг/мл до 0,2 пг/мл. Все образцы с концентрацией < 20 нг/мл нейтрализованы. При более высоких концентрациях антигена, образцы следует дополнительно развести для более эффективной нейтрализации.

13. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Описанные в инструкции "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА" и "Дженетик Системс ВИЧ-1 подтверждающий" Процедура выполнения анализа и Интерпретация результатов должны строго соблюдаться при тестировании антигена ВИЧ-1 (p24) в сыворотке, плазме крови человека и супернатанте клеточной культуры. Пользователю этого набора необходимо внимательно ознакомиться с инструкцией – вкладышем перед проведением теста. В частности, при анализе необходимо четко соблюдать требования по внесению образцов, раскапыванию реагента, промывке планшета и времени этапов инкубации.
- Отрицательные результаты могут наблюдаться, если количество данного маркера в образце слишком мало для пределов чувствительности теста, или, если маркер не присутствует в стадии заболевания, при которой был забран образец.

- Ошибка при дозировании образца или контроля может привести к ложно-отрицательному результату. Повторное тестирование должно либо подтвердить наличие инфекции, либо указать на ошибку в процедуре.
- Значение коэффициента поглощения (оптической плотности) содержимого лунок микропланшета менее 0,000 ОЕ указывает на ошибку процедуры или ошибку прибора. Измерение следует повторить.
- Другие ограничения указаны в соответствующем разделе инструкции к тесту "Дженетик Системс ВИЧ-1 АГ ИФА" (кат. номер 71120).

14. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. французскую версию.

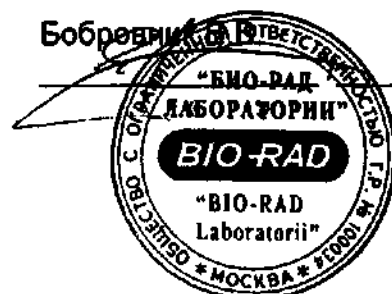
Скреплено и
протоколировано
11 (одиннадцать)
листов



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»

Бобровникова



2008 г.

Инструкция по применению изделия медицинского назначения тест-системы для диагностики in vitro ВИЧ-1 комплекта «Стандарт ВИЧ-1 антигена» (HIV 1 antigen standard)

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

СТАНДАРТ АНТИГЕНА ВИЧ1 предназначен для приготовления калибраторов при построении калибровочной кривой в рамках количественного анализа антигена ВИЧ1. Исследуются образцы, положительные в ИФА тестах для определения антигена, как наблюдается у некоторых ВИЧ инфицированных пациентов и пациентов, принимавших некоторые противовирусные препараты.

2. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Вирус ВИЧ1 (штамм BRU), выросший на культуре клеток СЕМ, очищенный ультрацентрифугированием, инактивированные, растворенные в детергенте и разведенные в человеческой сыворотке, отрицательной по HBs антигену, анти-ВГС антителам, ВИЧ1 и ВИЧ2 антителам.

Название на этикетке	Состав и описание реактива	Количество
S	Стандарт ВИЧ1 антигена : ВИЧ1 Ag (концентрация в нг/мл указана на этикетке)	1 флакон (1 мл лиофилизированный)

3. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

- Материал человеческого происхождения, использованный для получения этого реагента был исследован, и в нем не было обнаружено поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag), антител к вирусу гепатита С (ВГС) и антител к вирусам иммунодефицита (ВИЧ-1 и ВИЧ-2 Ag).

- Так как ни один из известных методов исследования не может полностью гарантировать отсутствие инфекционных агентов, обращайтесь с реагентами и биологическими образцами, как потенциально способными к переносу инфекции.
- Подробно правила техники безопасности и меры предосторожности описаны в инструкции к тест-системе ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС ВИЧ-1 АГ ИФА.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Качество полученных результатов зависит от соблюдения следующих правил Good Laboratory Practices:

- Не используйте реактивы с истекшим сроком годности.
- Перед использованием необходимо выдержать реагенты 30 минут при комнатной температуре (18 – 30 °C) для их стабилизации.
- Другие меры предосторожности описаны в инструкции к тест-системе ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС ВИЧ-1 АГ ИФА.

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА

Растворить содержимое флакона в 1 мл дистиллированной воды. Для того чтобы получить раствор в рабочей концентрации 1000 лг/мл используйте разведение с коэффициентом: 1/Концентрация, где концентрация указана на этикетке флакона.

Пример: Если концентрация, обозначенная на этикетке флакона с реагентом, составляет 10 нг/мл, то для приготовления рабочей концентрации реагент необходимо развести 1/10 : 100 мкл разведенного стандарта смешать с 900 мкл отрицательной сыворотки.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ - СРОК ГОДНОСТИ

- Стандартный раствор после разведения аликвотировать и хранить при – 20 °C. При соблюдении этих температурных условий каждая аликвота остается стабильной до окончания срока годности, указанного на упаковке реагента.
- Приготовленный в лаборатории раствор в рабочей концентрации 1000 лг/мл хранению не подлежит.
- Не нагревайте раствор.
- Не подвергайте раствор замораживанию-оттаиванию более одного раза.

7. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Собранные образцы следует обязательно развести человеческой сывороткой отрицательной по анти-ВИЧ1 и анти-ВИЧ2 антителам.
- Сбор и приготовление образцов осуществляются, следуя инструкции к ИФА тест-системе, которая используется совместно со стандартом для количественного анализа ВИЧ антигена.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ НАБОРА КАЛИБРАТОРОВ

Используя стандартный раствор в рабочей концентрации, приготовьте набор разведений для построения калибровочной кривой в соответствии с процедурой количественного анализа ВИЧ АГ, указанной в инструкции к используемой тест-системе. Если количественный анализ проводится с помощью диагностического набора ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС ВИЧ-1 АГ ИФА необходимо приготовить указанные в таблице разведения стандартного раствора в рабочей концентрации:

мкл раствора в рабочей концентрации 1000 пг/мл	мкл отрицательной человеческой сыворотки	Конечная концентрация пг/мл
0	300	0
10	990	10
20	980	20
50	950	50
100	900	100
200	800	200

Каждый калибратор должен быть использован в соответствии с процедурой количественного анализа, описанной в инструкции к используемому ИФА набору.

Используя полученные для каждого калибратора значения оптической плотности, строится калибровочная кривая в линейных координатах.

Концентрация каждого исследуемого образца может быть получена непосредственно из калибровочного графика при этом необходимо учитывать коэффициент разведения образцов.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Так как предельная концентрация антигена, определяемая с помощью тест-системы ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС ВИЧ-1 АГ ИФА составляет 8 пг/мл, а калибровочная кривая, полученная с помощью СТАНДАРТА ВИЧ1 АНТИГЕНА строится в области 0 – 100 пг/мл и является линейной зависимостью, данная тест-система позволяет количественно интерпретировать образцы с концентрацией в интервале 10 – 100 пг/мл. Образцы, в которых содержание антигена выше 100 пг/мл должны быть разведены и повторно оттестированы с помощью тест-системы ДЖЕНЕТИК СИСТЕМС ВИЧ-1 АГ ИФА

Скрепка № 4
прислано 3 (три)
листа

