

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2012 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО

«Фактор-Мед Продакшн»

Н.П.ПРИШЛЯК

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для
иммуноферментного количественного определения
антигена ВИЧ-1 p24

(ИФА-ВИЧ-1-АГ-ФАКТОР).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор предназначен для исследования сыворотки или плазмы крови человека на наличие антигена ВИЧ-1 p24 методом иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан, в зависимости от комплектации, на проведение 96, 192 или 480 анализов.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА.

Принцип анализа основан на методе твердофазного ИФА в «сэндвич» варианте с использованием биотин-стрептавидинового усиления специфического сигнала.

В составе иммуносорбента используются мышиные моноклональные антитела (МКАТ) к антигену ВИЧ-1 p24.

Конъюгат №1 состоит из смеси биотинилированных МКАТ к ВИЧ-1 p24.

При внесении в лунки планшета образцов сывороток (плазм) ВИЧ-инфицированной крови и конъюгата №1 антиген ВИЧ-1 p24, в случае его наличия, связывается с МКАТ к ВИЧ-1 p24 в составе иммуносорбента и биотинилированного конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляют пероксидазным конъюгатом стрептавидина (конъюгат №2).

После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор проявителя. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках планшета при двухволновом режиме (основной фильтр – 450 нм., референс фильтр – в диапазоне 620-650 нм.). Оптическая плотность пропорциональна концентрации антигена ВИЧ-1 p24 в образцах сыворотки или плазмы крови.

Чувствительность тест-системы при использовании Международного стандарта антигена p24 HIV-1 (NIBSC, код 90/636) составляет 0,4 МЕ/мл, антигена p24 HIV-1 (ABI, USA) – 1 пкг/мл, при тестировании «Стандарта АГ(+) ВИЧ-1 p24-МБА» (код REF A014, lot 1211/011) – 8 пкг/мл.

КОПИЯ
ВЕРНА

СОСТАВ НАБОРА:

Компонент	480 анализов	192 анализа	96 анализов
Иммунсорбент Полистироловый планшет, в лунках которого сорбированы моноклональные антитела к антигену p24 ВИЧ-1	5	2	1
Концентрат конъюгата №1 (11х) Биотинилированные антитела к антигену p24 ВИЧ-1. Синяя слегка опалесцирующая жидкость	2×2 мл	1×1,4 мл	1×0,8 мл
Концентрат конъюгата №2 (11х) Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Красная слегка опалесцирующая жидкость	1×7 мл	2×1,5 мл	1×1,5 мл
Положительный контроль Очищенный антиген p24 ВИЧ-1 в концентрации 16 пкг/мл (откалиброван относительно антигена p24 HIV-1, ABI, USA). Светло-желтая слегка опалесцирующая жидкость	2×2 мл	2×1,5 мл	2×1,5 мл
Отрицательный контроль Инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая антиген p24 ВИЧ-1, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусу гепатита С и Treponema pallidum. Светло-желтая слегка опалесцирующая жидкость	1×9 мл	1×7 мл	1×7 мл
Концентрат промывочного раствора (26х) Концентрат фосфатно-солевого буфера, содержит детергент. Бесцветная опалесцирующая жидкость, допускается расслоение и выпадение кристаллического осадка, который растворяется при нагревании.	2×140 мл	1×140 мл	1×90 мл
Раствор для разведения конъюгата №1 Фосфатно-солевой буфер, содержит детергент, казеиновую фракцию белков молока, блок-компоненты, краситель и консерванты. Синяя опалесцирующая жидкость	1×40 мл	1×14 мл	1×8 мл
Раствор для разведения конъюгата №2 Фосфатно-солевой буфер, содержит детергент, краситель и консерванты. Красная опалесцирующая жидкость	1×70 мл	1×30 мл	1×15 мл
ТМБ-субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в растворе, содержащем перекись водорода. Прозрачная бесцветная жидкость	1×60 мл	1×28 мл	1×14 мл
Стоп-реагент Раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.	1×60 мл	1×28 мл	1×14 мл
Клейкая пленка	15 шт.	6 шт.	3 шт.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности в лунках планшета при двухволновом режиме (основной фильтр-450нм., референс фильтр – в диапазоне 620-650 нм.);
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА (комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов);
- спирт этиловый, 70°;
- вата гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- пипетки одноканальные (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) и наконечники к ним;
- пипетки 8-канальные (50-300 мкл) и наконечники к ним;
- мерный стакан или цилиндр (1000 мл);
- ванночки для реагентов;
- флаконы для реагентов, 20 мл;
- термостат суховоздушный на температуру (42±2)°С;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- контейнер для твердых загрязненных отходов;
- контейнер для загрязненных жидкостей.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА.

1. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории.
2. При работе с набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальная обувь, защитные очки или щиток), так как образцы сыворотки или плазмы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.
3. Все промывные растворы собираются в специальный контейнер и обрабатываются дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, в концентрации и с экспозицией, указанных в инструкциях к применению.
4. Все твердые отходы собираются в специальный контейнер, обеззараживаются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
5. Лабораторная посуда многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, обеззараживаются с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.
6. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70° раствором этилового спирта.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ.

1. Не использовать набор после окончания срока годности.
2. Не смешивать компоненты наборов разных серий.
3. Тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.

4. Использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой.
5. Не допускать высыхания лунок на всех этапах постановки ИФА.
6. Использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
7. Исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования.
8. Не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении ИФА.

ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВКЕ.

Процедуру промывки необходимо выполнять в соответствии с требованиями инструкции. Некачественное промывание планшета может привести к получению некорректных результатов.

Промывку планшета рекомендуется проводить с использованием вошера. В случае отсутствия вошера допускается промывка лунок 8-канальной пипеткой.

При каждой промывке необходимо выполнить следующие операции:

- полностью удалить содержимое лунок;
- полностью заполнить лунки промывочным раствором (не менее 350 мкл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- выдержать лунки с промывочным раствором в течение 40-60 секунд;
- полностью удалить раствор из лунок.

На поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки жидкости, перевернув планшет и постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.

Образцы сыворотки или плазмы крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 72 часов. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже -20°C) не более двух раз. Необходимо осветлять образцы сыворотки (плазмы), которые содержат агрегаты и осадок, с помощью центрифугирования.

Образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом не пригодны для анализа.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.

Компоненты набора и анализируемые образцы крови должны быть выдержаны при комнатной температуре (18-25)°C в течение не менее 30 минут до начала анализа и оставаться при указанной температуре в течение постановки анализа.

После использования компоненты набора следует хранить при температуре (2-8)°C.

Иммуносорбент.

Извлеките необходимое количество стрипов из упаковки, вставьте их в рамку. Неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8)°C не больше 30 дней.

Промывочный раствор.

Содержимое одного флакона концентрата промывочного раствора интенсивно взболтайте. Если концентрат раствора содержит кристаллы, прогрейте его при температуре 37°C до полного растворения кристаллов. Разведите концентрат раствора (26х) дистиллированной водой согласно таблице, перемешайте.

Количество лунок	Дистиллированная вода, мл	Концентрат промывочного раствора, мл
8	175	7
16	275	11
32	375	15

Приготовленный промывочный раствор можно хранить не более 10 дней при температуре (2-8)°C.

Раствор конъюгата № 1.

Разведите в чистом флаконе концентрат конъюгата №1 (11х) раствором для разведения конъюгата №1 согласно таблице. Тщательно перемешайте, не допуская пенообразования.

Количество лунок	Раствор для разведения конъюгата №1, мл	Концентрат конъюгата №1, мкл
8	0,5	50
16	1	100
32	2	200

Раствор готовят непосредственно перед использованием, остатки раствора не хранятся.

Раствор конъюгата № 2.

Разведите в чистом флаконе концентрат конъюгата № 2 (11х) раствором для разведения конъюгата № 2 согласно таблице. Тщательно перемешайте, не допуская пенообразования.

Количество лунок	Раствор для разведения конъюгата №2, мл	Концентрат конъюгата №2, мкл
8	1	100
16	2	200
32	4	400

Раствор готовят непосредственно перед использованием, остатки раствора не хранятся.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

- Подготовьте планшет с необходимым количеством лунок.
- Подготовьте пять двукратных разведений положительного контроля. Для этого в лунки В1, С1, D1, E1 внесите по 100 мкл отрицательного контроля. В лунки А1 и В1 добавьте по 100 мкл положительного контроля. Далее выполните двукратное титрование положительного контроля отрицательным контролем, перенося по 100 мкл из лунки В1 в С1, из С1 в D1, из D1 в E1. Из лунки E1 100 мкл содержимого удалите. Перед каждым переносом содержимое лунок перемешайте пипетированием. Конечная концентрация антигена ВИЧ-1 р24 в лунках А1, В1, С1, D1, E1 – 16, 8, 4, 2, 1 пкг/мл, соответственно.
- В лунку F1 внесите 100 мкл отрицательного контроля. В остальные лунки внесите по 100 мкл исследуемых сывороток (плазм).
- Внесите в лунки по 50 мкл раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении.
- Перемешайте содержимое лунок при малой амплитуде встряхивания в течение 15-20 секунд.
- Закройте планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при температуре $(42 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 60 минут.
- Промойте планшет 6 раз промывочным раствором (так, как это описано в разделе *Требования к промывке*).
- Внесите в лунки по 100 мкл раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении.
- Накройте планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при комнатной температуре $(18-25^\circ\text{C})$ в течение 30 минут.
- Промойте планшет 6 раз промывочным раствором.
- Внесите в лунки по 100 мкл ТМБ-субстрата.
- Накройте планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при комнатной температуре $(18-25^\circ\text{C})$ в темном месте в течение 30 минут.
- Внесите в лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки цветной реакции (в той же последовательности внесения, что и ТМБ-субстрат).
- Не более чем через 5 минут после остановки цветной реакции измерьте оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (основной фильтр – 450 нм., референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм). Визуальный учет результатов не допускается.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

- Рассчитайте среднее значение оптической плотности (ОП) отрицательного контроля – OK_{cp} .
- Исключите значение ОК, которое больше 0,1 либо в 2 раза отличается от OK_{cp} . Рассчитайте OK_{cp} по оставшимся значениям.
- Проведение анализа считают достоверным, если OK_{cp} не больше 0,1, а ОП положительного контроля с концентрацией 16 пкг/мл не меньше 1,0.
- Рассчитайте граничное значение (ГЗ), прибавляя константную величину к OK_{cp} . $ГЗ = OK_{cp} + 0,1$.
- Результат анализа считается отрицательным, если ОП исследуемого образца меньше ГЗ.

- Результат анализа считается положительным, если ОП исследуемого образца больше ГЗ.
- Для количественного анализа полученных результатов исследования на наличие антигена ВИЧ-1 р24 постройте калибровочный график, откладывая на оси Y значения оптической плотности шести контролей (отрицательного и пяти положительных), а на оси X - соответствующие им концентрации антигена ВИЧ-1 р24.
- Используя построенный калибровочный график, определите концентрацию антигена ВИЧ-1 р24 в каждом исследуемом образце согласно полученному значению оптической плотности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Хранение и транспортировка наборов должны производиться при температуре (2-8)°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре 21-28° С в течение 3 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора – 12 месяцев.

Промывочный раствор, приготовленный для использования, можно хранить при температуре 2-8° С не более 10 дней.

Приготовленные для использования растворы конъюгатов № 1 и № 2 хранению не подлежат.

Остальные компоненты набора можно хранить при температуре 2-8° С в течение всего срока годности набора. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора ИФА-ВИЧ-1-АГ-ФАКТОР, следует обращаться в ООО «Фактор-Мед Продакшн» по адресу: 119334, г. Москва, 5-ый Донской п-д., д. 15, тел/факс (495) 661-70-82.

«СОГЛАСОВАНО»

ГАУЗ КО «Калужский областной
Центр по профилактике и борьбе
со СПИД и инфекционными заболева-
ниями»

Главный врач

А.Н. Алешина

Зав. лабораторией

А.И. Мухина

2012 г.

Инструкцию составил:

Зав. производством
ООО «Фактор-Мед Продакшн»



Бурданов В.Н.

2012 г.

Пронумеровано, прошнуровано 7
и скреплено печатью Силь) листов

Ген. директор Юрий Викторов

Гл. бухгалтер Юрий Викторов

Дата 13.12.11

