

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 определения
антител к ВИЧ-1/2

(ИФА-ВИЧ-1/2-АТ-ФАКТОР)

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор предназначен для определения специфических антител классов IgG, IgM, IgA к вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 типов в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

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

ПРИНЦИП АНАЛИЗА.

Принцип анализа базируется на методе твердофазного ИФА в «сэндвич» варианте и представляет собой одноэтапную процедуру с одновременной инкубацией сывороток (плазм) крови и конъюгата.

При внесении в лунки планшета конъюгата и образцов исследуемых сывороток (плазм) крови ВИЧ-специфические антитела в случае их наличия связываются как с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, так и с антигенами конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело.

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 ВИЧ-специфических антител в образцах сыворотки или плазмы крови.

КОПИЯ
ВЕРНА

СОСТАВ НАБОРА:

Компонент	480 анализов	192 анализа	96 анализов
Иммунсорбент Полистироловый планшет, в лунках которого сорбированы рекомбинантные полипептиды – аналоги антигенов ВИЧ-1 env1 (gp120, gp41), gag1 (p24, p17) и ВИЧ-2 env2 (gp36)	5	2	1
Концентрат конъюгата (11х) Смесь рекомбинантных полипептидов – аналогов антигенов ВИЧ-1 (env1, gag1) и ВИЧ-2 (env2), конъюгированных с пероксидазой хрена. Красная слегка опалесцирующая жидкость	1×6 мл	1×2 мл	1×1,5 мл
Положительный контроль Очищенные иммуноглобулины класса IgG человека, специфические к ВИЧ. Светло-желтая слегка опалесцирующая жидкость	1×1,5 мл	1×1 мл	1×1 мл
Отрицательный контроль Инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, а также поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и антитела к вирусу гепатита С и Treponema pallidum. Светло-желтая слегка опалесцирующая жидкость	1×2 мл	1×1,5 мл	1×1,5 мл
Концентрат промывочного раствора (26х) Концентрат фосфатно-солевого буфера, содержит детергент. Бесцветная опалесцирующая жидкость, допускается расслоение и выпадение кристаллического осадка, который растворяется при нагревании	1×180мл	1×90 мл	1×90 мл
Раствор для разведения конъюгата Фосфатно-солевой буфер, содержит детергент, казеиновую фракцию белков молока, блок-компоненты, краситель и консерванты. Зеленая опалесцирующая жидкость	1×60 мл	1×20 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 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- 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 времени 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	175	7
32	250	10

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

Раствор конъюгата.

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

Количество лунок	Раствор для разведения конъюгата №1, мл	Концентрат конъюгата №1, мкл
8	1	100
16	1,5	150
32	3	300

Раствор готовят непосредственно перед использованием, остатки раствора не хранятся.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

- Подготовьте планшет с необходимым количеством лунок.
- Внесите в лунки по 60 мкл раствора конъюгата. Внесите исследуемые сыворотки (плазмы) и контроли:

- в лунки А1 и В1 - по 30 мкл положительного контроля;
- в лунки С1 и Е1 - по 30 мкл отрицательного контроля;
- в остальные лунки - по 30 мкл исследуемых образцов сывороток.

Осторожно пипетируют смесь в лунках (во время пипетирования происходит изменение цвета раствора в лунках с зеленого на синий).

- Закройте планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при температуре (37±2)°C в течение 90 минут.
- Промойте планшет 8 раз промывочным раствором (так, как это описано в разделе *Требования к промывке*).
- Внесите в лунки по 100 мкл ТМБ-субстрата.
- Закройте планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубируйте при комнатной температуре (18-25° 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 – ОК_{ср}. Исключите значение ОК, которое больше 0,1 либо в 2 раза превышает ОК_{ср}. Рассчитайте ОК_{ср} по оставшимся значениям.
- Проведение анализа считают достоверным, если ОК_{ср} не больше 0,1, а ОП положительного контроля не меньше 0,6.
- Рассчитайте граничное значение (ГЗ), прибавляя константную величину к ОК_{ср}.
 $ГЗ = ОК_{ср} + 0,1$.
- Результат анализа считается отрицательным, если ОП исследуемого образца меньше ГЗ.
- Результат анализа считается положительным, если ОП исследуемого образца больше ГЗ.
- Образцы, давшие положительный результат, необходимо исследовать повторно не

менее, чем в двух лунках набора.

- образцы положительные в одной или более лунках набора считают положительными;
- образцы отрицательные двух и более лунках набора считают отрицательными.

Все образцы, которые при повторном анализе были положительными, должны быть проверены подтверждающими тестами.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение наборов должно производиться в темном месте при температуре (2-8)°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25° С не более 3 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора – 15 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-1/2-АТ-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  Е.К. Алешина

Зав. лабораторией  А.И. Мухина

« 11 »  2012 г.

Инструкцию составил:

Зав. производством
ООО «Фактор-Мед Продакшн»



Бурданов В.Н.

2012 г.

Пронумеровано, прошнуровано 6
и скреплено печатью шесть листов.

Ген. директор Кришова И.И.

Гл. бухгалтер Кришова И.И.

Дата 13.12.2017

