

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 200_ г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»



В.Г. Нестеренко

_____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«ВИЧ-1,2 АГ/АТ КОМБОТЕСТ»

набора реагентов для одновременного выявления антител к ВИЧ 1 типа, ВИЧ 1 типа группы О, ВИЧ 2 типа и антигена р24 ВИЧ в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

Назначение

Набор реагентов «ВИЧ -1,2 АГ/АТ КОМБОТЕСТ», далее по тексту – Набор, предназначен для одновременного выявления антител к ВИЧ 1 типа, ВИЧ 1 типа группы О, ВИЧ 2 типа и антигена р24 ВИЧ в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

Принцип метода

Для проведения анализа используется полистироловый 96-луночный планшет, на поверхности лунок которого сорбированы синтетический пептид, представляющий собой иммунореактивную детерминанту субтипов ВИЧ-1 группы О, рекомбинантный протеин, представляющий собой иммунореактивные детерминанты белков оболочки вирусов ВИЧ-1 и ВИЧ-2,

Взамен инструкции по применению, утвержденной Главным
государственным санитарным врачом РФ 11.07.06 г.

а также рол белка ВИЧ, и, моноклональные антитела к белку р24. Конъюгат представляет собой смесь антигенов ВИЧ, упомянутых выше, и моноклональных антител к белку р24, конъюгированных с пероксидазой хрена. Тестируемый образец сыворотки крови инкубируется в лунке планшета-иммуносорбента, антиген р24 и/или антитела к ВИЧ-1,2 присутствующие в образце, связываются с соответствующими антителами или антигенами ВИЧ, которыми покрыта поверхность лунки. Затем, после стадии промывания лунок, вносится конъюгат, который, связывается с соответствующими антителами и/или антигеном р24 ВИЧ-1, уже связавшимися с соответствующими агентами на поверхности лунки. Не связавшиеся реагенты затем удаляют повторным промыванием, и в лунку вносится рабочий раствор хромогена, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. Цвет раствора в лунках, содержащих связавшийся конъюгат, в ходе инкубации становится голубовато-зеленым, после добавления стоп-реагента превращается в желтый. По завершении реакции оптическая плотность раствора (ОП) определяется на спектрофотометре при длине волны 450 нм/620 нм.

Состав набора

Ингредиент	Количество	Описание
Иммуносорбент	5 шт.	Полистироловый разборный планшет с прозрачными бесцветными лунками (12 стрипов по 8 лунок).
K ⁻ - отрицательный контрольный образец	2 фл. по 2,5 мл	Сыворотка крови человека, не содержащая антител к ВИЧ 1 типа, антител к ВИЧ 2 типа, к гепатиту С, антиген ВИЧ-1 р24, Т-лимфотропного вируса, HBsAg.

		Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] .
К ₁ ⁺ - положительный контрольный образец ВИЧ-1	1 фл. 1,7 мл	Сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ 1 типа, не содержащая антител к ВИЧ 2 типа, к гепатиту С, HBsAg. Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] . Готов к применению.
К ₂ ⁺ - положительный контрольный образец ВИЧ-2	1 фл. 1,7 мл	Сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ 2 типа, и не содержащая антител к ВИЧ 1 типа, к гепатиту С, антигену р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] . Готов к применению.
К _{АГ} ⁺ - положительный контрольный образец антигена р24 ВИЧ	1 фл. 1,7 мл	Рекомбинантный антиген р24 ВИЧ 1 типа, в буферном растворе. Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] . Готов к применению.
Раствор для разведения образцов	1 фл. 18 мл	Буферный раствор, содержащий бычью сыворотку, мышиную сыворотку, детергент, сапонин. Консервант - 0,05% ПроКлин [®] - 300. Прозрачная зеленого цвета жидкость. Готов к применению.

Конъюгат	3 фл. по 1,1 мл	Смесь рекомбинантных антигенов (env и pol) ВИЧ 1 и 2 типов, пептидного антигена ВИЧ 1 типа группы О и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ 1 типа, конъюгированная с пероксидазой хрена. Лиофилизированный порошок или таблетка красного цвета.
Раствор для разведения конъюгата	3 фл. по 22 мл	Буферный раствор, содержащий бычью сыворотку, сапонин и детергент. Консервант - 0,05% ПроКлин [®] - 300. Прозрачная желтого цвета жидкость. Готов к применению.
Хромоген	1 фл. 35 мл	Раствор, содержащий 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (ТМБ) и стабилизаторы. Прозрачная оранжевого цвета жидкость.
Раствор для разведения хромогена	1 фл. 35 мл	Раствор цитрата натрия и перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.
Отмывающий раствор (концентрат x20)	2 фл. по 125 мл	20-кратный концентрат буферного раствора, содержащий глицин. Консервант - 0,2% Бронидокс [®] . Прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.
Стоп – реагент	2 фл. по 20 мл	1,0 М раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.

Меры предосторожности при работе с набором

- Не следует модифицировать и изменять процедуру проведения

анализа. Не заменять реагенты, входящие в состав тест-набора данной серии, на реагенты тест-систем от других изготовителей, а также на реагенты других серий тест-системы «ВИЧ 1,2 АГ/АТ КОМБОТЕСТ». Не уменьшать время инкубации, рекомендуемое данной инструкцией.

- Перед началом проведения анализа выдержать набор реагентов при температуре от 18 до 30 °С в течение 30 минут. Сразу после использования остатки реагентов следует поместить в места их хранения (температура хранения от 2 до 8°С).

- Лабораторная стеклянная посуда, предназначенная для приготовления рабочих растворов реагентов, должна быть предварительно тщательно вымыта с использованием 1,0 М соляной кислоты и затем промыта очищенной водой. Следует отдавать предпочтение одноразовой пластиковой посуде.

- Во время хранения или проведения анализа не подвергать реагенты воздействию прямого солнечного света.

- Во время проведения анализа не допускать подсыхания стенок лунок.

- Предусмотреть меры по предотвращению перекрестной контаминации реагентов. Важно, например, использовать одну маркированную пипетку только для работы с рабочим раствором хромогена, а другую - только для работы с конъюгатом.

- Избегать забрызгивания краев лунок раствором конъюгата. Избегайте дотрагиваться до краев лунок кончиком пипетки с конъюгатом. Не выдувайте воздух из кончика пипетки одновременно с внесением очередного реагента в лунку. Для наиболее полного удаления реагента из кончика пипетки используется метод пипетирования.

- Перед измерением оптической плотности жидкости в лунках убедиться, что внешние поверхности лунок планшета чистые и сухие, а на внутренних поверхностях лунок нет пузырей воздуха.

- Избегать контаминации лунок тальком от одноразовых перчаток.

- Не использовать CO₂ инкубаторы для инкубации планшетов во время проведения анализа.
- Температура инкубации должна быть от 36 до 38 °С.

Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

1. Вода очищенная;
2. рН-метр;
3. Спектрофотометр;
4. Вошер;
5. Термостат;
6. Ламинарный шкаф;
7. Таймер;
8. Холодильник;
9. Дозаторы одноканальные или с фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 1-200 мкл, 100-1000 мкл, 1000- 5000 мкл;
10. Мерные цилиндры на 10 мл, 25 мл, 50 мл, 100 мл, 500 мл;
11. Вакуумный аспиратор, содержащий 5% гипохлорид натрия;
12. Перчатки резиновые.

Приготовление рабочих растворов реагентов

- Рабочий раствор конъюгата

Аккуратно встряхнуть флакон с конъюгатом, чтобы удалить частички лиофильно высушенной субстанции с резиновой пробки. Открыть флакон и влить содержимое одного флакона раствора для разведения конъюгата во флакон с конъюгатом. Плотнo закрыть флакон со смесью резиновой пробкой и тщательно перемешать, вращая и переворачивая флакон. Лиофильно высушенная субстанция должна раствориться в течение 30 мин. Время от

времени необходимо перемешивать содержимое флакона. Рабочий раствор конъюгата имеет красный цвет.

Рабочий раствор конъюгата хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 4 недель.

- Рабочий раствор хромогена

В чистый стеклянный флакон либо в новый полистироловый одноразовый флакон, к объему концентрата хромогена оранжевого цвета добавить равный объем бесцветного раствора для разведения хромогена. Полученный раствор имеет светло-желтый цвет.

Важно, чтобы процедура приготовления проводилась в указанном порядке и чтобы все используемые пипетки и лабораторное стекло были чистыми. Рабочий раствор хромогена может быть приготовлен следующим образом: путем простого добавления содержимого одного флакона раствора для разведения хромогена во флакон, содержащий концентрат хромогена. Содержимого одного флакона, приготовленного таким образом рабочего раствора хромогена достаточно, как минимум, для 5 планшетов (см. Таблицу). Рабочий раствор хромогена готовится непосредственно перед добавлением в лунки планшета и не хранится.

Таблица

Количество лунок												Количество планшетов			
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88		1	2	3	4
Количество концентрата хромогена, мл															
1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0		6	12	18	22
Количество жидкости для разведения хромогена, мл															
1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0		6	12	18	22

- Отмывающий раствор (концентрат x20)

Развести 20-кратный концентрат раствора для промывки в 20 раз очищенной водой для получения требуемого конечного объема. Или

развести объем содержимого одного флакона концентрата раствора буфера для промывки очищенной водой до конечного объема 2500 мл.

Рабочий раствор буфера для промывки следует хранить при температуре от 15 до 30 °С в плотно закрытом сосуде в течение 1 мес.

Анализируемые образцы

Для анализа необходимо использовать неразведенную сыворотку или плазму крови человека. Для получения сывороток из вены берут кровь в пробирку для центрифугирования и выдерживают при температуре от 18 до 30 °С не менее 3 ч, либо при температуре от 36 до 38 °С – 1 ч. Далее центрифугируют 30 мин при 1200 об/мин. Для получения плазмы крови используют консервант ЭДТА или цитрат натрия.

Образцы исследуемых сывороток могут выдерживать нагревание до 56 °С в течение 3 ч.

Образцы, отобранные для анализа, должны храниться при температуре от 2 до 8 °С не более 72 ч.

Образцы сывороток или плазмы, не использованные для анализа в течение 72 ч, заморозить и хранить при температуре от минус 15 до минус 25 °С. Необходимо избегать замораживания и оттаивания образцов более трех раз.

Проведение анализа

-Выдержать набор реагентов при температуре от 18 до 30 °С в течение 30 мин.

-Рассчитать необходимое количество стрипов для анализа с учетом контролей (K^- , K_1^+ , K_2^+ , K_{AG}^+).

-Внести по 25 мкл раствора для разведения образцов в каждую лунку.

-Внести по 100 мкл исследуемых сывороток и контрольных образцов в лунки планшета (K^- , K_1^+ , K_2^+ , K_{AG}^+). Для каждого полного планшета используйте лунки первого ряда для внесения контрольных образцов.

-Внести контроли в указанные лунки после того, как все образцы уже внесены, а именно: внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-) в лунки A1, B1 и C1; по 100 мкл положительных контрольных образцов (K_1^+ , K_2^+ , K_{AG}^+) в лунки D1, E1, F1 соответственно.

-Использовать поверхность белого цвета для визуализации факта внесения всех образцов в лунки.

-Закрыть планшет крышкой и поместить его в термостат на 60 мин при температуре от 36 до 38 °C.

-По окончании инкубации промыть лунки планшета рабочим промывочным раствором 5 раз, при этом убедитесь, что:

- разливаемый в лунки объем составляет 500 мкл, при использовании вошера убедитесь, что лунки заполняются полностью;
- высота игл вошера для розлива должна быть установлена таким образом, чтобы отмывающая жидкость полностью заполняла лунки и не переливалась через их край;
- время одного цикла отмывки планшета, включающего наполнение лунок/отмывку/аспирацию/замачивание, составляет примерно 30 сек;
- при окончательной аспирации лунок в них не должна оставаться жидкость; используйте, где это технически возможно, процедуру двойной аспирации или осушайте лунки осторожно постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

-Сразу после отмывки лунок планшета внести в каждую из них по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

-Закрыть планшет крышкой и поместить его в термостат на 30 мин при температуре от 36 до 38 °C.

-По окончании инкубации пятикратно отмыть лунки планшета тем же раствором и по той же схеме как указано выше.

-Сразу после отмывки лунок планшета внести в каждую из них по 100 мкл рабочего раствора хромогена.

-Закрыть планшет крышкой и поместить его в термостат на 30 мин при температуре от 36 до 38 °С.

-Избегать попадания прямого солнечного света на планшет. В лунках, содержащих положительные образцы, развивается голубовато-зеленое окрашивание.

-Внести в каждую из лунок по 50 мкл стоп-реагента.

-Сразу, но не позднее 15 мин, измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм и референс-фильтре с длиной волны от 620 до 690 нм. Предварительно бланкировать фотометр по воздуху.

Регистрация и интерпретация результатов

Регистрация результатов

-Результаты, полученные на каждом планшете, должны учитываться отдельно, независимо от того, сколько планшетов взято в постановку анализов.

-Вычислить среднее значение оптической плотности отрицательного контроля (K^-).

Пример:

Лунка A1	0.084 о.е.
Лунка B1	0.086 о.е.
Лунка C1	0.070 о.е.
Среднее значение	$0.240/3 = 0.080$ о.е.

-Вычислить критический уровень $ОП_{крит}$ путем добавления 0,150 к среднему значению оптической плотности отрицательного контроля: ($ОП_{K^-} + 0,15$).

Среднее значение ОП отрицательного контроля - 0.080 о.е.

Критический уровень ($ОП_{крит}$) = $0.080 + 0.150 = 0.230$ о.е.

-Рекомендуется классифицировать образцы со значением $ОП_{450/620} > ОП_{(K^-)} + 0.07$ о.е., но $< ОП_{(K^-)} + 0.15$ о.е., как погранично положительные (серая зона). Погранично положительные образцы должны быть перетестированы в повторях. Если погранично реактивный результат повторяется, или если получены противоречивые результаты, необходимо тестировать образцы с использованием тест-системы другого производителя или в подтверждающем тесте:

- если получен положительный результат при использовании тест-систем другого производителя или в подтверждающем тесте, то считается, что сыворотка содержит антитела к ВИЧ- антигенам;
- если значение $ОП_{450}$ образца остается в серой зоне, или если получены противоречивые результаты, то донор или больной, чья кровь исследовалась, в дальнейшем нуждается в наблюдении врача.

Если значение $ОП_{450/620}$ образца $< ОП_{(K^-)} + 0.07$ о.е., образец считается нереактивным (отрицательным).

-Результаты анализа можно учитывать, если соблюдены следующие критерии:

- среднее значение оптической плотности отрицательного контроля должно быть меньше, чем 0.15 о.е;
- значение оптической плотности любого из положительных контролей должно быть на 0.8 о.е. больше, чем среднее значение ОП отрицательного контроля.

Постановка анализа, которая не удовлетворяет указанным условиям, должна быть повторена.

Интерпретация результатов

-Образцы, оптическая плотность которых оказалось меньше критического уровня в постановке, рассматриваются как отрицательные.

-Образцы, оптическая плотность которых оказалась равной или выше значения критического уровня в постановке, рассматриваются как положительные.

-Рекомендуется классифицировать образцы со значением $ОП_{450/620} > ОП_{(к-)} + 0.07$ о.е., но $< ОП_{(к-)} + 0.15$ о.е., как погранично положительные (серая зона).

Аналитические характеристики набора

1. Чувствительность

1) При контроле на стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ 1 типа (ОСО 42-28-2 12-02П) все образцы должны иметь $ОП > ОП_{(крит)}$.

Чувствительность – 100%.

2) При контроле на стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ 2 типа (ОСО 42-28-216-02) образцы должны иметь $ОП > ОП_{(крит)}$.

Чувствительность – 100%.

3) При контроле на стандартной панели сывороток, содержащих антиген р24 ВИЧ 1 типа (ОСО 42-28-375-05) – значение ОП сыворотки, содержащей антиген в концентрации 25 пг/мл должно быть $\geq ОП_{(крит)}$.

Минимальная чувствительность набора реагентов при выявлении антигена р24 ВИЧ 1 должна быть 25 пг/мл.

2. Специфичность

При контроле на стандартной панели, не содержащей антитела к ВИЧ (ОСО-42-28-214-02) ОП всех образцов должна быть $< ОП_{(крит)}$.

Специфичность – 100%.

Условия хранения и транспортирования набора

Транспортирование наборов должно проводиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 3 суток. Замораживание не допускается.

Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

Срок годности

Срок годности - 12 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество Набора направлять в адрес предприятия – изготовителя: ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» Россия, 125047, г. Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д.2/11, стр.2, тел./факс (495) 741-49-89 и в адрес Национального органа контроля МИБП, ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, Россия, 119002, г. Москва, пер..Сивцев Вражек, д. 41, (495) 241-39-22.

Генеральный директор
ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»



В.Г. Нестеренко



УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный

санитарный врач

Российской Федерации


Г.Г. Онищенко

« 14 » 11 / 2007 г.

№ 01-11/217-0X

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«ВИЧ-1,2 АГ/АТ КОМБОТЕСТ»

набора реагентов для одновременного выявления антител к ВИЧ 1 типа, ВИЧ 1 типа группы О, ВИЧ 2 типа и антигена р24 ВИЧ в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

Назначение

Набор реагентов «ВИЧ -1,2 АГ/АТ КОМБОТЕСТ», далее по тексту – Набор, предназначен для одновременного выявления антител к ВИЧ 1 типа, ВИЧ 1 типа группы О, ВИЧ 2 типа и антигена р24 ВИЧ в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

Принцип метода

Для проведения анализа используется полистироловый 96-луночный планшет, на поверхности лунок которого сорбированы синтетический пептид, представляющий собой иммунореактивную детерминанту субтипов ВИЧ-1 группы О, рекомбинантный протеин, представляющий собой иммунореактивные детерминанты белков оболочки вирусов ВИЧ-1 и ВИЧ-2,

Взамен инструкции по применению, утвержденной Главным государственным санитарным врачом РФ 11.07.06 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Руководитель Национального

органа контроля МИБП

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича

Роспотребнадзора


Медуницын Н.В.
«01» сентября 2007г.

а также роl белка ВИЧ, и, моноклональные антитела к белку р24. Конъюгат представляет собой смесь антигенов ВИЧ, упомянутых выше, и моноклональных антител к белку р24, конъюгированных с пероксидазой хрена. Тестируемый образец сыворотки крови инкубируется в лунке планшета-иммуносорбента, антиген р24 и/или антитела к ВИЧ-1,2 присутствующие в образце, связываются с соответствующими антителами или антигенами ВИЧ, которыми покрыта поверхность лунки. Затем, после стадии промывания лунок, вносится конъюгат, который, связывается с соответствующими антителами и/или антигеном р24 ВИЧ-1, уже связавшимися с соответствующими агентами на поверхности лунки. Не связавшиеся реагенты затем удаляют повторным промыванием, и в лунку вносится рабочий раствор хромогена, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. Цвет раствора в лунках, содержащих связавшийся конъюгат, в ходе инкубации становится голубовато-зеленым, после добавления стоп-реагента превращается в желтый. По завершении реакции оптическая плотность раствора (ОП) определяется на спектрофотометре при длине волны 450 нм/620 нм.

Состав набора

Ингредиент	Количество	Описание
Иммуносорбент	5 шт.	Полистироловый разборный планшет с прозрачными бесцветными лунками (12 стрипов по 8 лунок).
К ⁻ - отрицательный контрольный образец	2 фл. по 2,5 мл	Сыворотка крови человека, не содержащая антител к ВИЧ 1 типа, антител к ВИЧ 2 типа, к гепатиту С, антиген ВИЧ-1 р24, Т-лимфотропного вируса, HBsAg.

		Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] .
К ₁ ⁺ - положительный контрольный образец ВИЧ-1	1 фл. 1,7 мл	Сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ 1 типа, не содержащая антител к ВИЧ 2 типа, к гепатиту С, HBsAg. Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] . Готов к применению.
К ₂ ⁺ - положительный контрольный образец ВИЧ-2	1 фл. 1,7 мл	Сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ 2 типа, и не содержащая антител к ВИЧ 1 типа, к гепатиту С, антигену р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] . Готов к применению.
К _{АГ} ⁺ - положительный контрольный образец антигена р24 ВИЧ	1 фл. 1,7 мл	Рекомбинантный антиген р24 ВИЧ 1 типа, в буферном растворе. Инактивированная; прозрачная светло-желтого цвета жидкость. Консервант - 0,05% Бронидокс [®] . Готов к применению.
Раствор для разведения образцов	1 фл. 18 мл	Буферный раствор, содержащий бычью сыворотку, мышиную сыворотку, детергент, сапонин. Консервант - 0,05% ПроКлин [®] - 300. Прозрачная зеленого цвета жидкость. Готов к применению.

Конъюгат	3 фл. по 1,1 мл	Смесь рекомбинантных антигенов (env и pol) ВИЧ 1 и 2 типов, пептидного антигена ВИЧ 1 типа группы О и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ 1 типа, конъюгированная с пероксидазой хрена. Лиофилизированный порошок или таблетка красного цвета.
Раствор для разведения конъюгата	3 фл. по 22 мл	Буферный раствор, содержащий бычью сыворотку, сапонин и детергент. Консервант - 0,05% ПроКлин [®] - 300. Прозрачная желтого цвета жидкость. Готов к применению.
Хромоген	1 фл. 35 мл	Раствор, содержащий 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (ТМБ) и стабилизаторы. Прозрачная оранжевого цвета жидкость.
Раствор для разведения хромогена	1 фл. 35 мл	Раствор цитрата натрия и перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.
Отмывающий раствор (концентрат x20)	2 фл. по 125 мл	20-кратный концентрат буферного раствора, содержащий глицин. Консервант - 0,2% Бронидокс [®] . Прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.
Стоп – реагент	2 фл. по 20 мл	1,0 М раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.

Меры предосторожности при работе с набором

- Не следует модифицировать и изменять процедуру проведения

анализа. Не заменять реагенты, входящие в состав тест-набора данной серии, на реагенты тест-систем от других изготовителей, а также на реагенты других серий тест-системы «ВИЧ 1,2 АГ/АТ КОМБОТЕСТ». Не уменьшать время инкубации, рекомендуемое данной инструкцией.

- Перед началом проведения анализа выдержать набор реагентов при температуре от 18 до 30 °С в течение 30 минут. Сразу после использования остатки реагентов следует поместить в места их хранения (температура хранения от 2 до 8°С).

- Лабораторная стеклянная посуда, предназначенная для приготовления рабочих растворов реагентов, должна быть предварительно тщательно вымыта с использованием 1,0 М соляной кислоты и затем промыта очищенной водой. Следует отдавать предпочтение одноразовой пластиковой посуде.

- Во время хранения или проведения анализа не подвергать реагенты воздействию прямого солнечного света.

- Во время проведения анализа не допускать подсыхания стенок лунок.

- Предусмотреть меры по предотвращению перекрестной контаминации реагентов. Важно, например, использовать одну маркированную пипетку только для работы с рабочим раствором хромогена, а другую - только для работы с конъюгатом.

- Избегать забрызгивания краев лунок раствором конъюгата. Избегайте дотрагиваться до краев лунок кончиком пипетки с конъюгатом. Не выдувайте воздух из кончика пипетки одновременно с внесением очередного реагента в лунку. Для наиболее полного удаления реагента из кончика пипетки используется метод пипетирования.

- Перед измерением оптической плотности жидкости в лунках убедиться, что внешние поверхности лунок планшета чистые и сухие, а на внутренних поверхностях лунок нет пузырей воздуха.

- Избегать контаминации лунок тальком от одноразовых перчаток.

- Не использовать CO₂ инкубаторы для инкубации планшетов во время проведения анализа.
- Температура инкубации должна быть от 36 до 38 °С.

Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

1. Вода очищенная;
2. рН-метр;
3. Спектрофотометр;
4. Вошер;
5. Термостат;
6. Ламинарный шкаф;
7. Таймер;
8. Холодильник;
9. Дозаторы одноканальные или с фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 1-200 мкл, 100-1000 мкл, 1000- 5000 мкл;
10. Мерные цилиндры на 10 мл, 25 мл, 50 мл, 100 мл, 500 мл;
11. Вакуумный аспиратор, содержащий 5% гипохлорид натрия;
12. Перчатки резиновые.

Приготовление рабочих растворов реагентов

- Рабочий раствор конъюгата

Аккуратно встряхнуть флакон с конъюгатом, чтобы удалить частички лиофильно высушенной субстанции с резиновой пробки. Открыть флакон и влить содержимое одного флакона раствора для разведения конъюгата во флакон с конъюгатом. Плотнo закрыть флакон со смесью резиновой пробкой и тщательно перемешать, вращая и переворачивая флакон. Лиофильно высушенная субстанция должна раствориться в течение 30 мин. Время от

времени необходимо перемешивать содержимое флакона. Рабочий раствор конъюгата имеет красный цвет.

Рабочий раствор конъюгата хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 4 недель.

- Рабочий раствор хромогена

В чистый стеклянный флакон либо в новый полистироловый одноразовый флакон, к объему концентрата хромогена оранжевого цвета добавить равный объем бесцветного раствора для разведения хромогена. Полученный раствор имеет светло-желтый цвет.

Важно, чтобы процедура приготовления проводилась в указанном порядке и чтобы все используемые пипетки и лабораторное стекло были чистыми. Рабочий раствор хромогена может быть приготовлен следующим образом: путем простого добавления содержимого одного флакона раствора для разведения хромогена во флакон, содержащий концентрат хромогена. Содержимого одного флакона, приготовленного таким образом рабочего раствора хромогена достаточно, как минимум, для 5 планшетов (см. Таблицу). Рабочий раствор хромогена готовится непосредственно перед добавлением в лунки планшета и не хранится.

Таблица

Количество лунок												Количество планшетов			
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88		1	2	3	4
Количество концентрата хромогена, мл															
1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0		6	12	18	22
Количество жидкости для разведения хромогена, мл															
1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0		6	12	18	22

- Отмывающий раствор (концентрат x20)

Развести 20-кратный концентрат раствора для промывки в 20 раз очищенной водой для получения требуемого конечного объема. Или

развести объем содержимого одного флакона концентрата раствора буфера для промывки очищенной водой до конечного объема 2500 мл.

Рабочий раствор буфера для промывки следует хранить при температуре от 15 до 30 °С в плотно закрытом сосуде в течение 1 мес.

Анализируемые образцы

Для анализа необходимо использовать неразведенную сыворотку или плазму крови человека. Для получения сывороток из вены берут кровь в пробирку для центрифугирования и выдерживают при температуре от 18 до 30 °С не менее 3 ч, либо при температуре от 36 до 38 °С – 1 ч. Далее центрифугируют 30 мин при 1200 об/мин. Для получения плазмы крови используют консервант ЭДТА или цитрат натрия.

Образцы исследуемых сывороток могут выдерживать нагревание до 56 °С в течение 3 ч.

Образцы, отобранные для анализа, должны храниться при температуре от 2 до 8 °С не более 72 ч.

Образцы сывороток или плазмы, не использованные для анализа в течение 72 ч, заморозить и хранить при температуре от минус 15 до минус 25 °С. Необходимо избегать замораживания и оттаивания образцов более трех раз.

Проведение анализа

-Выдержать набор реагентов при температуре от 18 до 30 °С в течение 30 мин.

-Рассчитать необходимое количество стрипов для анализа с учетом контролей (K^- , K_1^+ , K_2^+ , K_{AG}^+).

-Внести по 25 мкл раствора для разведения образцов в каждую лунку.

-Внести по 100 мкл исследуемых сывороток и контрольных образцов в лунки планшета (K^- , K_1^+ , K_2^+ , K_{AG}^+). Для каждого полного планшета используйте лунки первого ряда для внесения контрольных образцов.

-Внести контроли в указанные лунки после того, как все образцы уже внесены, а именно: внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-) в лунки A1, B1 и C1; по 100 мкл положительных контрольных образцов (K_1^+ , K_2^+ , K_{AG}^+) в лунки D1, E1, F1 соответственно.

-Использовать поверхность белого цвета для визуализации факта внесения всех образцов в лунки.

-Закрыть планшет крышкой и поместить его в термостат на 60 мин при температуре от 36 до 38 °C.

-По окончании инкубации промыть лунки планшета рабочим промывочным раствором 5 раз, при этом убедитесь, что:

- разливаемый в лунки объем составляет 500 мкл, при использовании вошера убедитесь, что лунки заполняются полностью;
- высота игл вошера для розлива должна быть установлена таким образом, чтобы отмывающая жидкость полностью заполняла лунки и не переливалась через их край;
- время одного цикла отмывки планшета, включающего наполнение лунок/отмывку/аспирацию/замачивание, составляет примерно 30 сек;
- при окончательной аспирации лунок в них не должна оставаться жидкость; используйте, где это технически возможно, процедуру двойной аспирации или осушайте лунки осторожно постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

-Сразу после отмывки лунок планшета внести в каждую из них по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

-Закрыть планшет крышкой и поместить его в термостат на 30 мин при температуре от 36 до 38 °C.

-По окончании инкубации пятикратно отмыть лунки планшета тем же раствором и по той же схеме как указано выше.

-Сразу после отмывки лунок планшета внести в каждую из них по 100 мкл рабочего раствора хромогена.

-Закрыть планшет крышкой и поместить его в термостат на 30 мин при температуре от 36 до 38 °С.

-Избегать попадания прямого солнечного света на планшет. В лунках, содержащих положительные образцы, развивается голубовато-зеленое окрашивание.

-Внести в каждую из лунок по 50 мкл стоп-реагента.

-Сразу, но не позднее 15 мин, измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм и референс-фильтре с длиной волны от 620 до 690 нм. Предварительно бланкировать фотометр по воздуху.

Регистрация и интерпретация результатов

Регистрация результатов

-Результаты, полученные на каждом планшете, должны учитываться отдельно, независимо от того, сколько планшетов взято в постановку анализов.

-Вычислить среднее значение оптической плотности отрицательного контроля (K^-).

Пример:

Лунка A1	0.084 о.е.
Лунка B1	0.086 о.е.
Лунка C1	0.070 о.е.
Среднее значение	$0.240/3 = 0.080$ о.е.

-Вычислить критический уровень $ОП_{крит}$ путем добавления 0,150 к среднему значению оптической плотности отрицательного контроля: ($ОП_{K^-} + 0,15$).

Среднее значение ОП отрицательного контроля - 0.080 о.е.

Критический уровень ($ОП_{крит}$) = $0.080 + 0.150 = 0.230$ о.е.

-Рекомендуется классифицировать образцы со значением $ОП_{450/620} > ОП_{(K^-)} + 0.07$ о.е., но $< ОП_{(K^-)} + 0.15$ о.е., как погранично положительные (серая зона). Погранично положительные образцы должны быть перетестированы в повторях. Если погранично реактивный результат повторяется, или если получены противоречивые результаты, необходимо тестировать образцы с использованием тест-системы другого производителя или в подтверждающем тесте:

- если получен положительный результат при использовании тест-систем другого производителя или в подтверждающем тесте, то считается, что сыворотка содержит антитела к ВИЧ- антигенам;
- если значение $ОП_{450}$ образца остается в серой зоне, или если получены противоречивые результаты, то донор или больной, чья кровь исследовалась, в дальнейшем нуждается в наблюдении врача.

Если значение $ОП_{450/620}$ образца $< ОП_{(K^-)} + 0.07$ о.е., образец считается нереактивным (отрицательным).

-Результаты анализа можно учитывать, если соблюдены следующие критерии:

- среднее значение оптической плотности отрицательного контроля должно быть меньше, чем 0.15 о.е;
- значение оптической плотности любого из положительных контролей должно быть на 0.8 о.е. больше, чем среднее значение ОП отрицательного контроля.

Постановка анализа, которая не удовлетворяет указанным условиям, должна быть повторена.

Интерпретация результатов

-Образцы, оптическая плотность которых оказалось меньше критического уровня в постановке, рассматриваются как отрицательные.

-Образцы, оптическая плотность которых оказалась равной или выше значения критического уровня в постановке, рассматриваются как положительные.

-Рекомендуется классифицировать образцы со значением $ОП_{450/620} > ОП_{(к-)} + 0.07$ о.е., но $< ОП_{(к-)} + 0.15$ о.е., как погранично положительные (серая зона).

Аналитические характеристики набора

1. Чувствительность

1) При контроле на стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ 1 типа (ОСО 42-28-2 12-02П) все образцы должны иметь $ОП > ОП_{(крит)}$.
Чувствительность – 100%.

2) При контроле на стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ 2 типа (ОСО 42-28-216-02) образцы должны иметь $ОП > ОП_{(крит)}$.
Чувствительность – 100%.

3) При контроле на стандартной панели сывороток, содержащих антиген р24 ВИЧ 1 типа (ОСО 42-28-375-05) – значение ОП сыворотки, содержащей антиген в концентрации 25 пг/мл должно быть $\geq ОП_{(крит)}$.

Минимальная чувствительность набора реагентов при выявлении антигена р24 ВИЧ 1 должна быть 25 пг/мл.

2. Специфичность

При контроле на стандартной панели, не содержащей антитела к ВИЧ (ОСО-42-28-214-02) ОП всех образцов должна быть $< ОП_{(крит)}$.

Специфичность – 100%.

Условия хранения и транспортирования набора

Транспортирование наборов должно проводиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 3 суток. Замораживание не допускается.

Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

Срок годности

Срок годности - 12 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество Набора направлять в адрес предприятия – изготовителя: ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» Россия, 125047, г. Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская; д.2/11, стр.2, тел./факс (495) 741-49-89 и в адрес Национального органа контроля МИБП, ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, Россия, 119002, г. Москва, пер.Сивцев Вражек, д. 41, (495) 241-39-22.

Генеральный директор
ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»



В.Г. Нестеренко



Handwritten signature and date: 16.09.17