

УТВЕРЖДАЮ

**Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации**



«16» 06 2010 г. **Т. Г. Онищенко**

№ 01/11-91-10

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ»**

**Тест-система иммуноферментная
для одновременного выявления антител к вирусу иммунодефицита человека 1
и 2 типов (ВИЧ -1 и ВИЧ-2), ВИЧ -1 группы О и
антигена ВИЧ-1 (p24)**

Набор включает в себя следующие реагенты:

иммуносорбент - полистироловые 96-луночные разборные планшеты, в лунках которых сорбирована смесь рекомбинантных антигенов - gr41 ВИЧ-1, gr41 ВИЧ-1 группы О, gr36 ВИЧ-2 и моноклональные антитела к антигену p24 ВИЧ-1;

конъюгат-1 в рабочем разведении, жидкий – смесь рекомбинантных антигенов - gr41ВИЧ-1, gr41ВИЧ-1 группы О, gr36 ВИЧ-2, конъюгированных с биотином и моноклональных антител к антигену p24 ВИЧ-1, конъюгированных с биотином;

конъюгат-2 (концентрат x 11), жидкий - смесь рекомбинантных антигенов - gr41 ВИЧ-1, gr41 ВИЧ-1 группы О, gr36 ВИЧ-2, конъюгированных с пероксидазой хрена и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена;

К- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1,2, антиген p24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инаktivированный;

К⁺_{АТ} (контрольный положительный образец антител), жидкий – смесь сывороток крови человека, содержащих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, или смесь

Взамен инструкции 01-11/2609 от 23.03.2009 г.

сыворотки крови человека, содержащей антитела к ВИЧ-1 и сыворотки крови иммунной козы, содержащей антитела к рекомбинантному антигену gp36 ВИЧ-2, (сыворотка крови человека не содержит антиген p24ВИЧ-1, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С); инаktivированный;

K⁺_{АГ} (контрольный положительный образец антигена), жидкий – очищенный рекомбинантный антиген p24 ВИЧ-1 в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к ВИЧ-1,2, антиген p24ВИЧ-1, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инаktivированный;

РРК-2 - раствор для разведения конъюгата-2;

ПР - промывочный раствор (концентрат х 25) - для промывания иммуносорбента;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ - хромоген - тетраметилбензидин, жидкий;

стоп-реагент – раствор серной кислоты 0,20 моль/л.

Набор выпускается в трех комплектах:

комплект №1 - один разборный планшет - рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

комплект №2 - два разборных планшета - рассчитан на проведение 192 определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 192 (96 х 2) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

комплект №3 - пять разборных планшетов - рассчитан на проведение 480 определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора

или для одновременной постановки 480 (96 x 5) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент — разборный полистироловый 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками;

Конъюгат-1 - опалесцирующая оранжевого цвета жидкость, допустимо образование темного осадка, растворяющегося при встряхивании;

Конъюгат-2 (концентрат x 11)- прозрачная бесцветная жидкость;

K⁺_{АТ} (контрольный положительный образец антител) - прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость;

K⁺_{АГ} (контрольный положительный образец антигена) - прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость;

K⁻ (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость;

РРК-2 - раствор для разведения конъюгата-2 — прозрачная или опалесцирующая синего цвета жидкость, допустимо образование темного осадка, растворяющегося при встряхивании;

ПР - промывочный раствор (концентрат x 25) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - субстратный буферный раствор - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - хромоген - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для одновременного выявления суммарных антител к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов, первого типа группы О и антигена р24 ВИЧ-1 в сыворотке (плазме) крови человека.

Чувствительность набора по выявлению минимального количества антигена р24 ВИЧ-1 – не менее 5 пг/мл.

Меры безопасности

Контрольные образцы тест-системы изготовлены из термоинактивированных сывороток. При работе с тест-системой в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток крови человека следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы из-под компонентов, лабораторная посуда и т. д.) следует обеззараживать погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твёрдые отходы следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) следует обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч), или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГс/см² (0,15 МПа) и температуре от 124 °С до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Способ применения:

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание: иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги внутри лунок!

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Для отбора проб использовать пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения, не более, указанной в паспорте на данное оборудование.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху».

2. Термошейкер;

3. Устройство для промывания планшетов (вошер);

4. Пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл, с наконечниками;

5. Пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;

6. Вода очищенная;

7. Бумага фильтровальная лабораторная;

8. Перчатки резиновые или пластиковые;

9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

10. Для постановки ИФА в автоматическом режиме - любая модель ИФА-анализаторов открытого типа (например, автоматический анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyser» производства фирмы «TECAN», Австрия).

2. Приготовление растворов

Все растворы необходимо отбирать одноразовыми наконечниками!

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблицах 1 (при ручной постановке ИФА) и 2 (при постановке ИФА в автоматическом режиме).

Таблица 1

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Кол-во стрипов	ПР (рабочий раствор)		Конъюгат-1	Конъюгат-2 (рабочий раствор)		Субстратная смесь	
	ПР (концентрат х 25) (мл)	Вода очищенная (мл)		Конъюгат-2 (концентрат х 11) (мл)	РРК-2 (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	8,0	192	0,3	0,075	0,750	1,0	0,1
2	8,0	192	0,6	0,150	1,50	2,0	0,2
3	16,0	384	0,9	0,225	2,25	3,0	0,3
4	16,0	384	1,2	0,300	3,00	4,0	0,4
5	24,0	576	1,5	0,375	3,75	5,0	0,5
6	24,0	576	1,8	0,450	4,50	6,0	0,6
7	32,0	768	2,1	0,525	5,25	7,0	0,7
8	32,0	768	2,4	0,600	6,00	8,0	0,8
9	40,0	960	2,7	0,675	6,75	9,0	0,9
10	40,0	960	3,0	0,750	7,50	10,0	1,0
11	40,0	960	3,3	0,825	8,25	10,0	1,0
12 (целый планшет)	40,0	960	6,0	1,2	12,00	15,0	1,5

Таблица 2

Расход реагентов набора при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа (на одновременное проведение 96 определений)

12 (целый планшет)	ПР (рабочий раствор)		Конъюгат-1 (мл)	Конъюгат-2 (рабочий раствор)		Субстратная смесь	
	ПР (концентрат х 25) (мл)	Вода очищенная (мл)		Конъюгат-2 (концентрат х 11) (мл)	РРК-2 (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
	40,0	960	6,0	1,2	12,0	15,0	1,5

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Необходимое количество концентрата отобрать в отдельную емкость и развести в 25 раз водой очищенной (см. табл. 1 или 2). Полученный раствор тщательно перемешать. Приготовленный рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

К⁺_{АТ} - контрольный положительный образец антител, готов к применению.

К⁺_{АГ} - контрольный положительный образец антигена, готов к применению.

К⁻ - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

Конъюгат-1, готов к применению.

РРК-2 - раствор для разведения конъюгата-2, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Конъюгат-2, рабочий раствор - готовить перед использованием. Из флакона с РРК-2 отобрать необходимое количество реагента, перенести в чистый флакон и добавить соответствующее количество концентрата конъюгата-2 (см. табл. 1 или 2). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Перед использованием выдержать не менее 10 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Хранение: рабочий раствор конъюгата-2 хранить не более 1 месяца в защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием, хранению не подлежит. Необходимое количество СБ перенести в чистый флакон, затем добавить необходимое количество ТМБ (см. табл. 1 или 2), содержимое флакона тщательно перемешать.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Хранение реагентов: после вскрытия флаконов оставшиеся неиспользованными реагенты тест-системы: ПР (концентрат х 25), К⁻, К⁺_{АТ}, К⁺_{АГ},

конъюгат-1, конъюгат-2 (концентрат х 11), РРК-2, СБ, ТМБ, Стоп-реагент хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

3. Подготовка исследуемых образцов

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный пророст.

Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником!

Отобранные образцы хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным проростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо «осветлять» центрифугированием.

4. Проведение ИФА при ручной постановке.

4.1. Перед использованием набора необходимо вскрыть фольгированный пакет, вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Вставить в рамку нужное количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать (**осушитель не удалять!**). После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

4.2. Перед использованием иммуносорбент промыть 1 раз ПР, осторожно заливая его с помощью вошера, до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек и удалить промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

4.3. Во все лунки иммуносорбента внести по 30 мкл конъюгата-1. Для постановки анализа использовать неразведенные образцы сыворотки или плазмы. В зависимости от количества используемых стрипов контрольные образцы рекомендуется вносить по следующей схеме:

1 или 2 стрипа - по 70 мкл - 1 лунка K^{+}_{AT} , 1 лунка K^{+}_{AG} , 2 лунки K^{-} ;

3 стрипа и более - по 70 мкл - 1 лунка K^{+}_{AT} , 1 лунка K^{+}_{AG} , 3 лунки K^{-} ;

В остальные лунки внести по 70 мкл исследуемых образцов. При внесении образцов оранжевый цвет конъюгата-1 должен измениться на розовый. При тестировании плазмы или сыворотки, имеющих кислый pH, оранжевый цвет конъюгата-1 становится желтым. Некоторые образцы плазм, имеющих pH, близкий к нейтральному, после внесения цвет конъюгата-1 не меняют.

4.4. Планшет закрыть крышкой и выдержать 45 мин на шейкере при 500 об/мин и температуре 37,0 °C.

4.5. Содержимое лунок аккуратно удалить, с помощью промывочного устройства в ёмкость с дезинфицирующим раствором, планшет промыть 1 раз рабочим ПР, как указано в п 4.2.

4.6. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата-2. Планшет закрыть крышкой и выдержать 20 мин на термошейкере при 500 об/мин и температуре 37,0 °C.

4.7. Содержимое лунок с помощью вошера удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором и планшет промыть 6 раз ПР, как в п. 4.2.

4.8. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет в течение 20 мин при температуре от 18 до 24 °C в темном месте.

4.9. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 3 - 4 мин провести учет результатов.

5. Учёт результатов.

Учет результатов следует проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм и референс-светофилтре 620-680 нм с настройкой прибора «по воздуху». Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Результаты анализа учитывать, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с K^{-} не более 0,2, в лунках с K^{+}_{AT} , K^{+}_{AG} - не менее 0,8.

ОП крит. рассчитывают по формуле:

ОП крит. = ОП К- ср. + А, где А - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата.

Положительным считают образец со значением ОП, равным или превышающим ОП критическое (ОП крит.).

Отрицательным считают образец со значением ОП менее ОП крит.

Образцы, значения ОП которых равны или превышают ОП крит., должны быть исследованы повторно в 2 лунках. При получении аналогичных результатов образцы расценивать как положительные.

6. Проведение ИФА на автоматических анализаторах открытого типа (например, «TECAN Freedom EVOlyser» производства фирмы «TECAN», Австрия).

1. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные контейнеры, контрольные образцы K^{+AT} , K^{+AG} , K^{-} , образцы исследуемых сывороток в объеме не менее 300 мкл – во флаконы, которые устанавливают в соответствующие штативы анализатора; помещают в анализатор необходимое количество планшетов с иммуносорбентом.

2. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов K^{+AT} , K^{+AG} , K^{-} .

3. Результаты анализа учитывать, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с K^{-} не более 0,2, в лунках с K^{+AT} , K^{+AG} - не менее 0,8. Далее учет результатов проводить аналогично п 5.

Форма выпуска

Тест-систему выпускают в виде набора (комплекты 1, 2, 3)

	комплект 1	комплект 2	комплект 3
Иммуносорбент	1 шт.	2 шт.	5 шт.
Конъюгат-1	6,0 мл - 1 фл.	12,0 мл - 1 фл.	15,0 мл - 2 фл. или 30,0 мл - 1 фл.
Конъюгат-2 (концентрат х 11)	1,5 мл - 1 фл.	2,5 мл - 1 фл.	3,5 мл - 2 фл.
K ⁺ _{AT} - инактивированный - во флаконе	1,0 мл - 1 фл.	2,0 мл - 1 фл.	5,0 мл - 1 фл.
K ⁺ _{AG} - инактивированный, во флаконе	1,0 мл - 1 фл.	2,0 мл - 1 фл.	5,0 мл - 1 фл.
K ⁻ - инактивированный, во флаконе	3,0 мл - 1 фл.	4,0 мл - 1 фл.	5,0 мл - 2 фл.
РРК-2 – во флаконе	13,0 мл - 1 фл.	25,0 мл - 1 фл.	25,0 мл - 3 фл.
ПР (концентрат х 25) – во флаконе	50,0 мл - 1 фл.	80,0 мл - 1 фл.	80,0 мл - 3 фл. или 120,0 мл - 2 фл.
СБ – во флаконе	15,0 мл - 1 фл.	25,0 мл - 1 фл.	25,0 мл - 3 фл. или 50,0 мл - 2 фл.
ТМБ – во флаконе	1,5 мл - 1 фл.	2,5 мл - 1 фл.	3,5 мл - 2 фл.
Стоп-реагент – во флаконе	25,0 мл - 1 фл.	25,0 мл - 2 фл.	25,0 мл - 4 фл. или 50,0 мл - 2 фл.

Набор упакован в коробку картонную, куда вкладывается инструкция по применению.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

	комплект 1	комплект 2	комплект 3
Крышка к полистироловым 96-луночным планшета	1 шт.	2 шт.	5 шт.
Скрепка для фольгированного пакета	1 шт.	2 шт.	3 шт.
Пластиковые ванночки для жидких реагентов	2 шт.	4 шт.	10 шт.
Одноразовые наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора - 18 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 сут.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

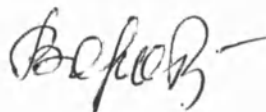
Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (495) 241-39-22, факс: (495) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству



В. К. Пименов

Зав. лаб. диагностики ВИЧ-инфекции,
арбовирусных инфекций и
риккетсиозов
ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора



М. С. Воробьева



Александров
12 (св. наряды)
Браун
Александр