

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от «26» июля 2013г. № 3519-Пр/13

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИГЕНА P24 И АНТИТЕЛ К ВИРУСУ
ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ВичИФА-НIV-Аг/Ат»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» предназначен для качественного определения антигена р24 и антител к ВИЧ-1,2 в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ВИЧ-инфекция представляет собой медленно прогрессирующее инфекционное заболевание, возникающее вследствие заражения вирусом иммунодефицита человека. Вирус иммунодефицита человека относится к семейству РНК-содержащих ретровирусов. Описаны 2 типа – ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Источником инфекции являются инфицированные люди – больные СПИДом и «вирусоносители». Вирус передается при половых контактах, переливании зараженной крови и ее препаратов, повторном использовании инфицированного меди-

цинского инструментария. Возможен также вертикальный механизм передачи возбудителя (трансплацентарный).

Антитела к ВИЧ появляются у 90-95% инфицированных в течение 3 месяцев после заражения, у 5-9% - через 6 месяцев от момента заражения, и у 0,5 – 1 % - в более поздние сроки.

Для более ранней диагностики ВИЧ-инфицирования (до наступления сероконверсии) используют тест-системы, которые определяют не только антитела к ВИЧ, но и антиген ВИЧ-1 р24. Антиген р24 появляется в крови через 1-3 недели после заражения и служит ранним маркером инфицирования.

1.3. Набор «ВичИФА-HIV-Аг/Ат» выпускается в четырех вариантах комплектации.

Комплектация на 96 определений рассчитана на проведение анализа в дубликатах 43 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация на 192 определения рассчитана на проведение анализа в дубликатах 86 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация на 480 определений рассчитана на проведение анализа в дубликатах 215 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация на 960 определений рассчитана на проведение анализа в дубликатах 430 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Обратите внимание, что определение оптических плотностей (ОП) контрольных проб и раствора ТМБ в соответствии со схемой маркировки лунок (п. 7.2.1.) обязательно при каждой постановке анализа.

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» использован «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы рекомбинантные антигены ВИЧ-1 (gp41и ВИЧ-2 (gp36) и моноклональные антитела к антигену р24, которые иммобилизованы на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), а также конъюгированы с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата gp41-gp36-анти-р24-пероксидаза во время инкубации одновременно происходит иммобилизация антигена р24 и/или антител к ВИЧ-1,2, содержащихся в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой (Рисунок 1).

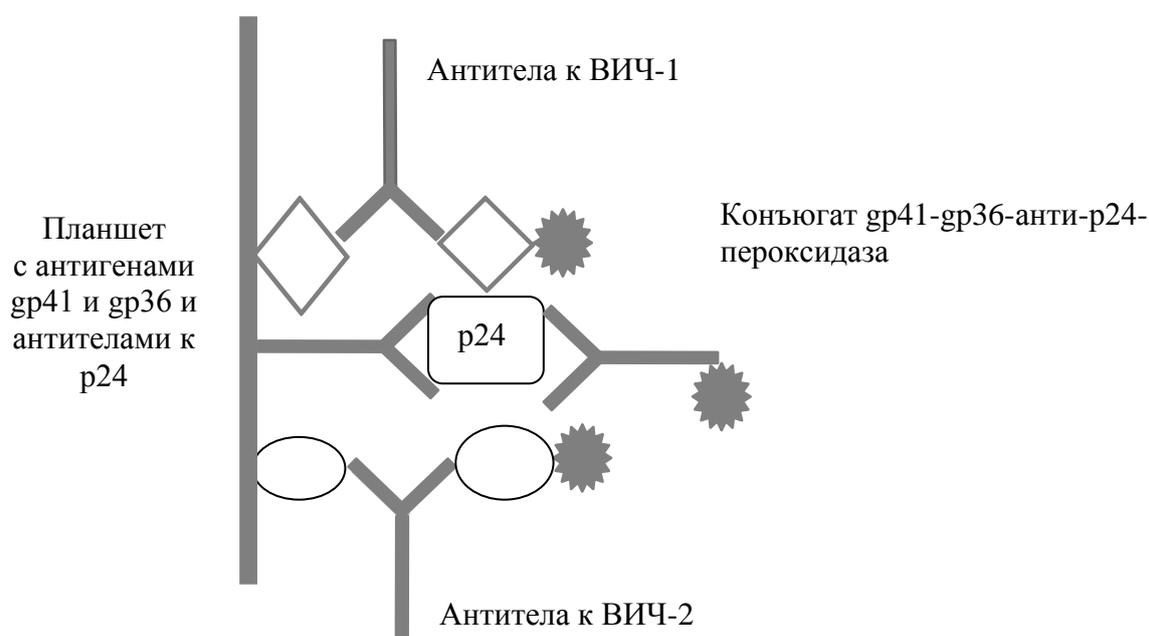


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антигена р24 и/или антител к ВИЧ-1,2 в анализируемых пробах. После измерения оптических плотностей растворов в лунках наличие антигена р24 и антител к ВИЧ-1,2 оценивают относительно значения ОПкрит. Положительными считают образцы со значением оптической плотности равным или превышающим значение ОПкрит. Отрицательными считают образцы со значением оптической плотности меньшим, чем значение ОПкрит.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами ВИЧ-1,2 и мышинными моноклональными антителами к антигену р24, маркирован «Стрипы с рекомбинантными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и моноклональными антителами к р24» – 1, 2, 5 или 10 упаковок в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- отрицательная контрольная проба (ОКП), не содержащая антиген р24 и антитела к ВИЧ-1,2. Флакон маркирован «Отрицательная контрольная проба» – 1 или 2 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 1,5 мл) или 2 или 4 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 2,0 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- ВИЧ-1 положительная контрольная проба (ВИЧ-1 ПКП), содержащая антитела к ВИЧ-1. Флакон маркирован «ВИЧ-1 положительная контрольная проба» – 1, 2 или 3 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 1,0 мл) или 2

флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 2,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- ВИЧ-2 положительная контрольная проба (ВИЧ-2 ПКП), содержащая антитела к ВИЧ-2. Флакон маркирован «ВИЧ-2 положительная контрольная проба» – 1, 2 или 3 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 1,0 мл) или 2 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 2,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- p24 положительная контрольная проба (P24 ПКП), содержащая антиген ВИЧ-1 p24. Флакон маркирован «P24 положительная контрольная проба» – 1, 2 или 3 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 1,0 мл) или 2 флакона (лиофилизированный препарат или жидкость по 2,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- конъюгат gp41-gp36-анти-p24-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1, 2 или 5 флаконов (по 5 мл, жидкость) или 3 флакона (по 16 мл, жидкость) или 1, 2, 5, 10 флаконов (лиофилизированный препарат) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- водно-солевой раствор для разведения конъюгата, маркирован «Буфер Е» (при включении в набор лиофилизованного конъюгата) — 1, 2, 5 или 10 флаконов в зависимости от варианта комплектации (по 9 мл) (Таблица 1);

- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1, 2 или 5 флаконов (по 5 мл) или 3 флакона (по 16 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2, 4, 10 или 20 флаконов (по 14 мл) или 1 флакон (250 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 14 мл) или 1 флакон (100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 14 мл) или 1 флакон (100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1, 2, 5 или 10 штук в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1).

Таблица 1. Варианты комплектации

Название компонента	96 определений (лифилизованный конъюгат)	96 определений (жидкий конъюгат)	192 определения (лиофилизированный конъюгат)	192 определения (жидкий конъюгат)
Комплект стрипов в рамке	1 шт.	1 шт.	2 шт.	2 шт.
Отрицательная контрольная проба	1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (1,5 мл)	2 фл. (по 1,5 мл)	2 фл. (по 1,5 мл)
ВИЧ-1 положительная контрольная проба	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	2 фл. (по 1,0 мл)	2 фл. (по 1,0 мл)
ВИЧ-2 положительная контрольная проба	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	2 фл. (по 1,0 мл)	2 фл. (по 1,0 мл)
P24 положительная контрольная проба	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	2 фл. (по 1,0 мл)	2 фл. (по 1,0 мл)
Конъюгат Е	-	1 фл. (5 мл)	-	2 фл. (по 5 мл)
Конъюгат Е (лиоф. препарат)	1 фл.	-	2 фл.	-
Буфер Е	1 фл. (9 мл)	-	2 фл. (по 9 мл)	-
Буфер А	1 фл. (5 мл)	1 фл. (5 мл)	2 фл. (по 5 мл)	2 фл. (по 5 мл)
Буфер Р	2 фл. (по 14 мл)	2 фл. (по 14 мл)	4 фл. (по 14 мл)	4 фл. (по 14 мл)
Раствор ТМБ	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)	2 фл. (по 14 мл)	2 фл. (по 14 мл)

Стоп-реагент	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)	2 фл. (по 14 мл)	2 фл. (по 14 мл)
Пакет полиэтиленовый закрывающийся	1 шт.	1 шт.	2 шт.	2 шт.

Название компонента	480 определений (лиофилизированный конъюгат)	480 определений (жидкий конъюгат)	960 определений (лиофилизированный конъюгат)	960 определений (жидкий конъюгат)
Комплект стрипов в рамке	5 шт.	5 шт.	10 шт.	10 шт.
Отрицательная контрольная проба	2 фл. (по 2 мл)	2 фл. (по 2 мл)	4 фл. (по 2 мл)	4 фл. (по 2 мл)
ВИЧ-1 положительная контрольная проба	3 фл. (по 1,0 мл)	3 фл. (по 1,0 мл)	2 фл. (по 2,5 мл)	2 фл. (по 2,5 мл)
ВИЧ-2 положительная контрольная проба	3 фл. (по 1,0 мл)	3 фл. (по 1,0 мл)	2 фл. (по 2,5 мл)	2 фл. (по 2,5 мл)
P24 положительная контрольная проба	3 фл. (по 1,0 мл)	3 фл. (по 1,0 мл)	2 фл. (по 2,5 мл)	2 фл. (по 2,5 мл)
Конъюгат E	-	5 фл. (по 5 мл)	-	3 фл. (по 16 мл)
Конъюгат E (лиоф. препарат)	5 фл.	-	10 фл.	-
Буфер E	5 фл. (по 9 мл)	-	10 фл. (по 9 мл)	-
Буфер A	5 фл. (по 5 мл)	5 фл. (по 5 мл)	3 фл. (по 16 мл)	3 фл. (по 16 мл)

Буфер Р	10 фл. (по 14 мл)	10 фл. (по 14 мл)	20 фл. (по 14 мл) или 1 фл. (250 мл)	20 фл. (по 14 мл) или 1 фл. (250 мл)
Раствор ТМБ	5 фл. (по 14 мл)	5 фл. (по 14 мл)	10 фл. (по 14 мл) или 1 фл. (100 мл)	10 фл. (по 14 мл) или 1 фл. (100 мл)
Стоп-реагент	5 фл. (по 14 мл)	5 фл. (по 14 мл)	10 фл. (по 14 мл) или 1 фл. (100 мл)	10 фл. (по 14 мл) или 1 фл. (100 мл)
Пакет полиэтиленовый закрывающийся	5 шт.	5 шт.	10 шт.	10 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность. Определяется как доля полученных отрицательных результатов в исследуемых образцах, не содержащих антиген ВИЧ-1 р24 и антитела к ВИЧ-1,2. Диагностическая специфичность набора «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» по ОСО 42-28-214-02П составляет 100%.

3.2. Диагностическая чувствительность. Определяется как доля полученных положительных результатов в исследуемых образцах, содержащих антитела к ВИЧ-1,2. Диагностическая чувствительность набора «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» по ОСО 42-28-212-02П и ОСО 42-28-216-02 составляет 100%.

3.3. Предел обнаружения антигена ВИЧ-1 р24 по ОСО 42-28-375-05 «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» не превышает 25 пг/мл.

3.4. Коэффициент вариации оптической плотности в одном и том же образце сыворотки крови человека при определении антигена ВИЧ-1 р24 и антител к ВИЧ-1,2 с использованием набора «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» не превышает 8%.

3.5. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич» -принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ВичИФА-HIV-Аг/Ат» хук-эффект не был обнаружен.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2...8 °С не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20 °С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие контрольные пробы готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных контрольных проб перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. Во флакон **с лиофилизированными контрольными пробами внести объем** дистиллированной воды, **указанный на соответствующей этикетке**, и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Буфер Е готов к использованию.

7.1.4. Жидкий конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,58 мл.

Для восстановления лиофилизованного конъюгата перед вскрытием флакона легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенке флакона или к крышке. Открыть флакон и положить крышку перевернутой на сухую поверхность.

Во флакон с **лиофилизированным конъюгатом** внести **1 мл** дистиллированной воды и закрыть крышкой. Выдержать флакон в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флакон, перемешать его содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флакон при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Весь объем содержимого флакона перенести во флакон с буфером Е. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,83 мл.

7.1.5. Буфер А готов к использованию. Расход буфера А на один стрип составляет 0,58 мл.

7.1.6. Промывочный раствор. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл Буфера Р+95 мл дистиллированной воды

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,16 мл.

7.1.8. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,16 мл.

7.1.9. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

На странице 23 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок.

ВНИМАНИЕ: схема маркировки и нанесения образцов отличается от стандартной схемы.

Лунки промаркировать следующим образом:

A1 – №1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

A2, B1, B2 – №2 - для измерения величины оптической плотности ОКП;

C1, C2 – №3 - для измерения величины оптической плотности ВИЧ-1 ПКП;

D1, D2 – №4 - для измерения величины оптической плотности ВИЧ-2 ПКП;

E1, E2 – №5 - для измерения величины оптической плотности P24 ПКП.

7.2.2. Во все лунки, кроме лунки A1, внести по 50 мкл буфера А.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл контрольных проб в дубликатах, в оставшиеся лунки - по 50 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: общее время внесения контрольных проб и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно отличаться, что в конечном итоге может привести к получению неправильного диагноза.

7.2.4. Во все лунки, кроме лунки A1, внести по 50 мкл конъюгата.

7.2.5. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании **в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500-700 об/мин.**

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки 4 раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.6, **встряхнуть рамку со стрипами на шейкере в течение 5 – 10 секунд** с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства. При автоматической промывке необходимо заполнять лунки полностью и следить за качеством аспирации.

7.2.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы **в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 20 минут.**

7.2.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре.

7.2.9. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.8., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунке А1 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Значение оптической плотности в лунке А1 не должно превышать 0,09 ед. опт.пл.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Оценить оптическую плотность в лунках, содержащих ОКП, для каждой лунки в отдельности. ОП должна быть не более 0,2 ед.опт.пл. Если значение ОП в одной из лунок не удовлетворяет этому критерию, то это значение можно исключить из расчета среднего арифметического значения ОП ОКП. **Исключить можно только одно значение ОП из трех. В случае если критерию не удовлетворяют ОП в двух или более лунках, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.**

9.2. По трем или двум значениям, в зависимости от выполнения условий, описываемых в п. 9.1., определить среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих ОКП.

9.3. Определить допустимый диапазон разброса значений ОП ОКП, для чего умножить среднее значение ОП ОКП на 0,6 и 1,4. Сравнить ОП в каждой лунке с расчетным диапазоном. Оптическая плотность каждой лунки, содержащей

ОКП, должна попадать в полученный диапазон. Если значение ОП в одной из лунок не удовлетворяет этому критерию, то это значение можно исключить и повторить операции, описанные в пп. 9.2 и 9.3. **Исключить одно значение ОП можно только в том случае, если в п. 9.1. ни одно из значений ОП исключено не было, в противном случае результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.**

9.4. Определить среднее арифметическое значение ОП, в лунках содержащих ВИЧ-1 ПКП. Полученное значение ОП должно быть больше 0,4 ед.опт.пл. Если полученное значение ОП меньше 0,4 ед.опт.пл., результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9.5. Определить среднее арифметическое значение ОП, в лунках содержащих ВИЧ-2 ПКП. Полученное значение ОП должно быть больше 0,4 ед.опт.пл. Если полученное значение ОП меньше 0,4 ед.опт.пл., результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9.6. Определить среднее арифметическое значение ОП, в лунках содержащих Р24 ПКП. Полученное значение ОП должно быть больше 0,4 ед.опт.пл. Если полученное значение ОП меньше 0,4 ед.опт.пл., результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9.7. Определить значение ОПкрит., для чего к среднему значению ОП ОКП прибавить Ккрит.

Примечание: *Ккрит.* – коэффициент, определяемый на предприятии-изготовителе, и указанный в аналитическом паспорте.

9.8. Разделить среднее значение ОП каждого исследуемого образца на получившееся значение ОПкрит.

Если полученное значение **меньше 1**, то считают, что исследуемый образец не содержит антигена ВИЧ-1 р24 и антител к ВИЧ-1,2.

Примечание: Следует с осторожностью относиться к результатам, которые немногим ниже ОПкрит. Если полученное значение больше или равно 0,9, рекомендуется исследовать образец повторно.

Если полученное значение **больше или равно 1**, то образец должен быть исследован повторно. **Только при получении аналогичных результатов считают, что образец содержит антиген ВИЧ-1 р24 и/или антитела к ВИЧ-1,2.**

Пример учета результатов:

- 1) ОП лунок, содержащих ОКП (ед.опт.плотн.):
ОКП№1 → $0,027 < 0,2$;
ОКП№2 → $0,033 < 0,2$;
ОКП№3 → $0,03 < 0,2$.
- 2) Среднее значение ОП ОКП (ед.опт.плотн.):
 $(0,027 + 0,033 + 0,03) / 3 = 0,03$.
- 3) Допустимый диапазон разброса значений ОП ОКП:
 $0,03 \times 0,6 = 0,018$;
 $0,03 \times 1,4 = 0,042$.
ОКП№1 → $0,018 \leq 0,027 \leq 0,042$;
ОКП№2 → $0,018 \leq 0,033 \leq 0,042$;
ОКП№3 → $0,018 \leq 0,03 \leq 0,042$.
- 4) Среднее значение ОП ВИЧ-1 ПКП(ед.опт.плотн.) → 1,2 (>0,4).
- 5) Среднее значение ОП ВИЧ-2 ПКП(ед.опт.плотн.) → 0,8 (>0,4).

6) Среднее значение ОП P24 ПКП(ед.опт.плотн.) $\rightarrow 0,6$ ($>0,4$).

7) Значение ОПкрит.:

$$\text{ОП ОКП} + \text{Ккрит.} = 0,03 + 0,075 = 0,105.$$

8) Средние значения ОП исследуемых образцов:

Образец № 1 $\rightarrow 0,04$;

Образец № 2 $\rightarrow 0,105$;

Образец № 3 $\rightarrow 1,32$.

«Диагноз» исследуемых образцов:

Образец № 1 $\rightarrow 0,04/0,105 = 0,4$ (меньше 1, отрицательный образец (не содержит антитела к ВИЧ-1,2);

Образец № 2 $\rightarrow 0,105/0,105 = 1,0$ (равно 1, требует повторного исследования);

Образец № 3 $\rightarrow 1,32/0,105 = 12,6$ (больше 1, требует повторного исследования).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ВичИФА-HIV-Аг/Ат» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение

ние всего срока годности;

- жидкие, готовые к использованию, контрольные пробы после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов контрольные пробы хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- восстановленный (растворенный) из лиофилизованного препарата и разведенный в буфере Е конъюгат хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- жидкий конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;

- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом контрольных проб;

- для каждого независимого эксперимента необходимо определять оптические плотности контрольных проб ОПкрит.;

- запрещается возвращать избыток конъюгата, буфера А, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных ре-

зультатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	50 мкл Буфера А	КТ +18 ...25°C	Внесение контрольных и исследуемых образцов не более 15'	В лунку для определения ОП ТМБ ничего не вносить. ОКП внести в триплите, ВИЧ-1 ПКП, ВИЧ-2 ПКП и Р24 ПКП - в дубликатах.
2		50 мкл контрольных проб			
3		50 мкл исследуемых образцов			
		50 мкл конъюгата Е			
4	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500-700об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор= 14 мл буфера Р +266 мл H ₂ O
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	20'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание		КТ	1 - 2'	шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
11	Обработка результатов				Калькулятор, соответствующее ПО

Примечание:

КТ — комнатная температура (+18...25°C);

ОП — оптическая плотность; *ПО* – программное обеспечение.

По вопросам качества набора «ВичИФА-НIV-Аг/Ат» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.