

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации


_____ Г. Онищенко

«15»

_____ 2009 г.

№

01-11/82-09

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин»

Тест-система иммуноферментная для выявления (подтверждения)
антигена р24 вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1),
набор диагностический

Содержание

I. Назначение	3
II. Состав набора	3
III. Меры предосторожности	4
IV. Инструкции по безопасности	5
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемое с набором реагентов	6
VI. Отбор и подготовка образцов	6
VII. Подготовка реагентов	6
VIII. Проведение анализа	8
IX. Результаты	10
X. Процедура выполнения подтверждающего теста	10
XI. Результаты подтверждающего теста	11
XII. Проведение анализа в автоматическом режиме	12
XIII. Срок годности. Условия хранения и транспортирования	13
XIV. Объяснение символов на внутренней упаковке	13

Набор реагентов выпускается в одном комплекте.

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений для выявления или 48 определений для подтверждения наличия антигена р24, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу – в случае выявления или по два стрипа – в случае подтверждения наличия антигена р24) использования набора или для одновременной постановки 96 определений для выявления или 48 определений для подтверждения наличия антигена р24 на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин» предназначен для выявления и подтверждения антигена р24 ВИЧ-1 в сыворотке (плазме) крови человека и супернатанте клеточной культуры методом иммуноферментного анализа.

Чувствительность набора при определении антигена р24 ВИЧ-1 – 0,5 пг/мл.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин»

Реагент	Форма выпуска
Иммуносорбент - полистироловый разборный планшет с бесцветными, прозрачными лунками, в которых сорбированы моноклональные антитела к антигену р24 ВИЧ-1.	1 планшет
Конъюгат-1 (концентрат х 11) - моноклональные антитела к антигену р24 ВИЧ-1, конъюгированные с биотином. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 0,75 мл
Конъюгат-2 (концентрат х 11) - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 0,75 мл
РРК-1 (раствор для разведения конъюгата – 1). Прозрачная или опалесцирующая жидкость оранжевого цвета.	1 флакон 8,0 мл
РРК-2 (раствор для разведения конъюгата-2). Прозрачная или опалесцирующая жидкость синего цвета.	1 флакон 8,0 мл
К+1 (контрольный положительный образец), инактивированный - рекомбинантный антиген р24 ВИЧ-1 в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к ВИЧ-1,2 и HCV, HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость малиново-красного цвета.	1 флакон 2,0 мл
К+2 (контрольный слабоположительный образец), лиофилизированный, инактивированный - рекомбинантный антиген р24 ВИЧ-1 в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к ВИЧ-1,2 и HCV, HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1. (концентрация $1 \pm 0,5$ пг/мл). Сухая, пористая, аморфная масса белого или светло-желтого цвета.	1 флакон
К- (контрольный отрицательный образец), инактивированный - термоинактивированная сыворотка крови человека, не содержащая антиген р24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и HCV. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость зеленого цвета.	1 флакон 3,0 мл
Промывочный раствор (концентрат х 25).	1 флакон

Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	80,0 мл
Субстратный буферный раствор, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор водорода перекиси, рН 4,2. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Хромоген ТМБ - раствор содержащий тетраметилбензидин (ТМБ). Прозрачная, бесцветная или светло-желтая жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,75 моль/л. Прозрачная, бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
АНТИ-р24-ПЛЮС, инактивированный, лиофилизированный - сыворотка крови человека, не содержащая антиген р24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и HCV с добавлением козьих антител к антигену р24 ВИЧ-1. Сухая пористая аморфная масса, розового цвета.	1 флакон
АНТИ-р24-МИНУС, лиофилизированный, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антиген р24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и HCV с добавлением нормальных козьих иммуноглобулинов, лиофилизированная. Сухая пористая аморфная масса, голубого цвета.	1 флакон

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

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов.
	Одноразовые наконечники.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком zip-lock.

III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий.
- Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Перед использованием все реагенты набора выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно использование материалов одноразового использования.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.
- Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: соблюдайте рекомендованное количество циклов промывки и убедитесь, что лунки полностью заполнены, не

допускайте остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду очищенную (по ФС-42-2619-97).
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики *in vitro*.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые для приготовления контрольного отрицательного образца, контрольного положительного образца, контрольного слабopоложительного образца, АНТИ-p24-ПЛЮС и АНТИ-p24-МИНУС были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена p24 ВИЧ-1, антител к вирусу гепатита С и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2.
- При работе с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Избегайте расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивируйте поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Избегайте контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализационную трубу. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дез. средства. Твердые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 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) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

X xi Некоторые реагенты содержат 0,05 % Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.

V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Одноразовые наконечники к пипеткам.
- Термостатируемый шейкер ($37,0 \pm 0,5$) °C.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-700 нм.
- При проведении анализа на автоматическом анализаторе для ИФА на планшетах - автоматический анализатор открытого типа (например «TECAN Freedom EVOlyser» производства фирмы «TECAN»).

VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведенную сыворотку или плазму или образцы клеточной культуры. Образцы сыворотки или плазмы, содержащие видимые частицы следует осветлить центрифугированием, т.к. частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложно-положительным результатам. Образцы культуры клеток следует осветлить центрифугированием для удаления клеток и дедбриса. Образцы культуры клеток, которые необходимо предварительно развести перед тестированием могут быть разведены культуральной клеточной средой эквивалентной той, которая использовалась в культуре клеток.

Образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 сут, допустимо хранение в замороженном состоянии при температуре минус 20 °C в течении 3 мес. Во избежание осаждения фибрина плазму следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре (39 ± 1) °C в водяной бане. Сыворотку (плазму) нельзя размораживать при температуре выше 40 °C из-за нестабильности ВИЧ Ag. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более 3-х раз. Нельзя использовать сыворотку (плазму) загрязненную, с гемолизом или гиперлипидемией.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты готовые к применению:

- К- - контрольный отрицательный образец
- К+1 - контрольный положительный образец
- РРК-1 - раствор для разведения конъюгата-1
- РРК-2 - раствор для разведения конъюгата-2
- Стоп-реагент

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Иммуносорбент. Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в пакет. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С, при условии, что пакет герметично закрыт с помощью скрепки. Силикагель удалять из пакета нельзя.

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (x 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (x 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. № 1 и 2). Полученный раствор тщательно перемешать. Приготовленный рабочий промывочный раствор стабилен в течение 3 дней при хранении при температуре от 2 до 8 °С в герметично укупоренном флаконе.

Рабочий раствор конъюгата-1. Содержимое флакона с концентратом конъюгата-1 осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Для приготовления рабочего раствора конъюгата-1 необходимый объем концентрата (x 11) конъюгата-1 развести соответствующим объемом РРК-1 в чистом флаконе (см. табл. №1, 2). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Выдержать рабочий раствор конъюгата-1 не менее 10 мин при температуре от 18 до 24 °С перед использованием. Рабочий раствор конъюгата-1 стабилен не более 12 ч при температуре от 18 до 24 °С в защищенном от света месте.

Рабочий раствор конъюгата-2. Содержимое флакона с концентратом конъюгата-2 осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Для приготовления рабочего раствора конъюгата-2 необходимый объем концентрата (x 11) конъюгата-2 развести соответствующим объемом РРК-2 в чистом флаконе (см. табл. № 1, 2). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Выдержать рабочий раствор конъюгата-2 не менее 10 мин при температуре от 18 до 24 °С перед использованием. Рабочий раствор конъюгата-2 стабилен не более 12 ч при температуре от 18 до 24 °С в защищенном от света месте.

Субстратная смесь (СС). Готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (см. табл. № 1, 2), тщательно перемешать до полного растворения. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в химически чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Контрольный слабоположительный образец (К+2). Содержимое флакона развести водой дистиллированной в объеме, указанном на этикетке контрольного слабоположительного образца. Приготовленный раствор выдержать перед использованием не менее 10 мин при комнатной температуре. Слабоположительный контрольный образец хранить не более 6 ч в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. **Титрование контрольного слабоположительного образца и растворение его в других объемах воды очищенной не производить!**

АНТИ-p24-ПЛЮС. Содержимое флакона (или ампулы) с лиофилизированным АНТИ-p24-ПЛЮС растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона. Приготовленный раствор выдержать перед использованием не менее 10 мин при комнатной температуре. Срок годности приготовленного раствора - не более 1 мес при температуре от 2 до 8 °С. При дробном использовании набора на протяжении более длительного срока приготовленный раствор разлить по аликвотам (150 мкл) и хранить в замороженном состоянии на протяжении срока годности тест-системы при температуре не выше минус 10 °С (не допускается замораживание и оттаивание реагента более 1 раза).

АНТИ-p24-МИНУС. Содержимое флакона (или ампулы) с лиофилизированным АНТИ-p24-МИНУС растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона. Приготовленный раствор выдержать перед использованием не менее 10 мин при комнатной температуре. Срок годности приготовленного раствора - не более 1 мес при температуре от 2 до 8 °С. При дробном использовании набора на протяжении более длительного срока приготовленный раствор разлить по аликвотам (150 мкл) и хранить в замороженном состоянии на протяжении срока годности тест-системы при температуре не выше минус 10 °С (не допускается замораживание и оттаивание раствора более 1 раза).

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся не использованными К+1, иммуносорбент, рабочие растворы АНТИ-p24-ПЛЮС и АНТИ-p24-МИНУС хранить не более 1 мес. Конъюгат-1 (концентрат x 11), Конъюгат-2 (концентрат x 11), контрольный положительный образец (К+1), контрольный отрицательный образец (К-), РРК-1, РРК-2, ПР (x25), СБ, ТМБ, стоп-реагент, хранятся в течение срока годности тест-системы. Рабочий раствор К+2 хранить не более 6 ч в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Рабочие растворы АНТИ-p24-ПЛЮС и АНТИ-p24-МИНУС розлитые по аликвотам хранятся в замороженном состоянии (температура не выше минус 10 °С) в течение 12 мес (не допускается замораживание и оттаивание раствора более 1 раза).

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 1:

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата-1		Рабочий раствор конъюгата-2		Субстратная смесь	
	ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат-1 (конц. x 11) (мл)	РРК-1 (мл)	Конъюгат-2 (конц. x 11) (мл)	РРК-2 (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	8,0	192,0	0,05	0,5	0,05	0,5	1,5	0,1
2	8,0	192,0	0,1	1,0	0,1	1,0	3,0	0,2
3	16,0	384,0	0,15	1,5	0,15	1,5	4,5	0,3

4	16,0	384,0	0,2	2,0	0,2	2,0	6,0	0,4
5	24,0	576,0	0,25	2,5	0,25	2,5	7,5	0,5
6	24,0	576,0	0,3	3,0	0,3	3,0	9,0	0,6
7	32,0	768,0	0,35	3,5	0,35	3,5	10,5	0,7
8	32,0	768,0	0,4	4,0	0,4	4,0	12,0	0,8
9	40,0	960,0	0,45	4,5	0,45	4,5	13,5	0,9
10	40,0	960,0	0,5	5,0	0,5	5,0	15,0	1,0
11	48,0	1152,0	0,55	5,5	0,55	5,5	16,5	1,1
12	80,0	1920,0	0,7	7,0	0,7	7,0	18,0	1,2

1. Перед использованием планшет промыть 2 раза рабочим ПР: осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

2. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1. В зависимости от количества используемых стрипов контрольные образцы по 100 мкл рекомендуется вносить по следующей схеме:

1-2 стрипа – К+1 - 1 лунка, К+2 - 1 лунка, К- - 2 лунки;

3 стрипа и более – К+1 - 1 лунка, К+2 - 2 лунки, К- - 3 лунки.

Когда тестируются образцы культуры клеток необходимо вместо отрицательного контрольного образца вносить контроли культуральной клеточной среды.

В остальные лунки внести по 100 мкл цельных исследуемых образцов. При внесении образцов оранжевый цвет конъюгата-1 должен измениться на розовый. При тестировании плазмы или сыворотки, имеющих кислый рН, оранжевый цвет конъюгата-1 становится желтым. Некоторые образцы плазм, имеющих рН близкий к нейтральному, после внесения цвет конъюгата-1 не меняют. Образцы культуры клеток так-же могут не изменять цвет конъюгата-1, это зависит от используемой культуральной среды.

3. Планшет выдержать 60 мин на термошейкере при скорости 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4. **Не удаляя содержимого лунок и не промывая планшет**, во все лунки внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-2. При этом розовый цвет лунок должен измениться на зеленый или фиолетовый. Планшет выдержать 30 мин на термошейкере при скорости 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

5. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 6 раз рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер как указано в п 1.

6. Во все лунки планшета внести по 150 мкл СС и выдержать незакрытый планшет в течение 25 мин при температуре от 20 до 24 $^\circ\text{C}$ в темном месте.

7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и через 3 - 4 мин провести учет результатов при основном фильтре 450 нм и референс-фильтре

620-700 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм. Далее см. раздел IX.

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

Присутствие или отсутствие определяемого антигена р24 ВИЧ-1 определяется сравнением оптической плотности, измеряемой для каждого образца, с расчетной величиной критической оптической плотности (ОПкрит.).

Результаты анализа учитывают, если ОП каждого контрольного отрицательного образца К- (или контроля культуры клеток) не более 0,1, значение оптической плотности (ОП) в лунке с К+1 - не менее 0,8, и в лунке с контрольным слабоположительным образцом К+2 – равно или выше ОПкрит. Если одно из значений ОП К- (или контроля культуры клеток) выходит за этот предел, его следует исключить из расчета среднего значения. Если исключению подлежат более одного значения ОП К-, анализ следует повторить.

ОП крит. рассчитывают по формуле:

ОП крит. = ОП К-ср. + А, где

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*.

* «Для серии № _____ величина коэффициента А _____»

Исследуемые образцы расцениваются как отрицательные: если ОП образца < ОПкрит.
Исследуемые образцы расцениваются как исходно реактивные: если ОП образца ≥ ОПкрит.

Исходно реактивные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках для подтверждения первоначального результата. Если при повторном исследовании величина ОП образца в обеих лунках меньше ОПкрит., то проба расценивается как негативная по антигену р24 ВИЧ-1. Если при повторном анализе величина ОП образца, по крайней мер, в одной из лунок равна или больше ОПкрит., то исходный результат воспроизводится. Все повторно реактивные образцы должны быть протестированы в подтверждающем тесте, основанном на реакции нейтрализации.

X. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО ТЕСТА

Минимальное количество исследуемых образцов при постановке подтверждающего теста на двух стрипах – 4 образца. Чувствительность теста по слабоположительному контрольному образцу (К+2) определяют только в одном из 12 стрипов иммуносорбента.

1. Перед использованием планшет промыть 2 раза рабочим ПР: осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

2. Во все лунки иммуносорбента внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1. В зависимости от количества используемых стрипов контрольные образцы по 100 мкл рекомендуется вносить по следующей схеме:

2 стрипа – К+1 - 3 лунки, К+2 - 1 лунка, К- - 4 лунки;

3 стрипа и более – К+1 - 3 лунки, К+2 - 2 лунки, К- - 5 лунок.

В остальные лунки внести по 100 мкл повторно реактивных образцов, каждый образец внести в 2 лунки планшета (1 лунку используют для внесения АНТИ-р24-ПЛЮС, 1 лунку – для АНТИ-р24-МИНУС). АНТИ-р24-ПЛЮС и АНТИ-р24-МИНУС внести по 20 мкл в лунки планшета согласно схеме.

Схема внесения реагентов на 2-х стрипах

	1	2
A	К-	Образец 1, АНТИ-р24- МИНУС
B	К-	Образец 1, АНТИ-р24- ПЛЮС
C	К-, АНТИ-р24- МИНУС	Образец 2, АНТИ-р24- МИНУС
D	К-, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 2, АНТИ-р24- ПЛЮС
E	К+1	Образец 3, АНТИ-р24- МИНУС
F	К+1, АНТИ-р24- МИНУС	Образец 3, АНТИ-р24- ПЛЮС
G	К+1, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 4, АНТИ-р24- МИНУС
H	К+2	Образец 4, АНТИ-р24- ПЛЮС

Схема внесения реагентов на 3-х стрипах и более

	1	2	3
A	К-	К+2	Образец 4, АНТИ-р24-МИНУС
B	К-	К+2	Образец 4, АНТИ-р24- ПЛЮС
C	К-	Образец 1, АНТИ-р24-МИНУС	Образец 5, АНТИ-р24-МИНУС
D	К-, АНТИ-р24- МИНУС	Образец 1, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 5, АНТИ-р24- ПЛЮС
E	К-, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 2, АНТИ-р24- МИНУС	Образец 6, АНТИ-р24-МИНУС
F	К+1	Образец 2, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 6, АНТИ-р24- ПЛЮС
G	К+1, АНТИ-р24- МИНУС	Образец 3, АНТИ-р24- МИНУС	Образец 7, АНТИ-р24-МИНУС
H	К+1, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 3, АНТИ-р24- ПЛЮС	Образец 7, АНТИ-р24- ПЛЮС

4. Планшет выдержать 60 мин на термошейкере при скорости 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Далее постановка реакции аналогична разделу VIII, пункты 4-7.

XI. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО ТЕСТА

Реакцию нейтрализации (подтверждения выявления антигена р24 ВИЧ-1) следует учитывать, если показатель нейтрализации К+1 после добавления АНТИ-р24-ПЛЮС составляет более 50 %.

Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле:

$$\frac{(\text{ОП к} - \text{ОП п})}{(\text{ОП к} - \text{ОП ср. К-})} \times 100 \%,$$

где ОП к – оптическая плотность образца после внесения АНТИ-р24-МИНУС;

ОП п – оптическая плотность образца после внесения АНТИ-p24-ПЛЮС;
 ОП ср.К- - средняя оптическая плотность контрольного отрицательного образца.

Образец считается положительным если:

1. значение ОП образца после внесения АНТИ-p24-МИНУС больше или равно ОПкрит.

ОП крит. рассчитывают по формуле:

ОП крит. = ОП К- ср. + А, где

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.

2. показатель нейтрализации оптической плотности образца не меньше 50 %.

Если образец не подвергается нейтрализации, его следует развести в 25 раз рабочим промывочным раствором и повторить тестирование. Если после разведения в 25 раз сохраняются высокие значения ОП и образец не подвергается нейтрализации, то рекомендуется развести исходный образец в 50 и более раз и снова провести анализ. Если образец, разведенный в 50 и более раз, подвергается нейтрализации более чем на 50%, то образец следует считать положительным. Если показатель нейтрализации менее 50% образец считать отрицательным.

XII. Проведение анализа в автоматическом режиме на анализаторе открытого типа «ТЕCAN Freedom EVOlyser» производства фирмы «ТЕCAN», Австрия (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторах открытого типа).

Таблица 2

Расход реагентов тест-системы на один планшет-иммуносорбент при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата-1		Рабочий раствор конъюгата-2		Субстратная смесь	
ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат-1 (конц. x 11) (мл)	РРК-1 (мл)	Конъюгат-2 (конц. x 11) (мл)	РРК-2 (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
80,0	1920,0	0,7	7,0	0,7	7,0	18,0	1,2

1. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные емкости, контрольные образцы К+1, К+2, К-, АНТИ-p24-ПЛЮС, АНТИ-p24-МИНУС, исследуемые образцы 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 (общее время 2 ч) прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К+1, К+2, К-.

3. Далее учет результатов проводить аналогично п 7 раздела VIII и разделу IX.

Чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН» при использовании:

стандартной панели сывороток крови человека, содержащих антиген р24 ВИЧ-1 в различных концентрациях по ТУ 9398-027-26329720-2007. Чувствительность набора по выявлению антигена р24 ВИЧ-1 с панелью «Стандарт АГ(+) ВИЧ-1 р24» – 0,5 пг/мл.

Специфичность набора «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН» при использовании стандартной панели сывороток, не содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ – 1,2) и антиген р24 ВИЧ-1 по ТУ 9398-027-26329720-2007. Специфичность набора с панелью «Стандарт АГ(-) ВИЧ» - 100%.

ХIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности - 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

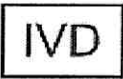

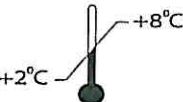
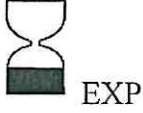

Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу Россия, 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

ХIV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ на внутренней упаковке

	Только для лабораторного использования
	Код партии (номер серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Содержит раздражающее вещество

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



В. К. Пименов
12.2008.