

«УТВЕРЖДАЮ»

**Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»**

О.Н.Шлюндин

«16»

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН»**

**Тест-система иммуноферментная
для одновременного выявления антител к вирусам иммунодефицита
человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), ВИЧ-1 группы О
и антигена р24 ВИЧ-1,
набор диагностический**

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора реагентов.....	3
III. Меры предосторожности.....	5
IV. Инструкции по безопасности.....	5
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов.....	6
VI. Отбор и подготовка образцов.....	6
VII. Подготовка реагентов.....	7
VIII. Проведение анализа.....	7
IX. Учет результатов.....	10
X. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	10
XI. Объяснение символов.....	11
Приложение 1.....	12
Приложение 2.....	15

Набор реагентов выпускается в 3 комплектах:

Комплект 1 рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) 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, возможна 3-кратная постановка на автоматических анализаторах (разборность 32 x 3).

Комплект 2 рассчитан на проведение 192 (два разборных планшета) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 192 (96 x 2) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Комплект 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) 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.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» - тест-система иммуноферментная (принцип «сэндвич») для одновременного выявления суммарных антител к ВИЧ-1 (включая все основные группы и субтипы), ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1 в сыворотке или плазме крови человека.

II. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска		
	Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный до стрипов (или до лунок), в лунках которого сорбированы: смесь рекомбинантных антигенов – gp160, gp41, p31 ВИЧ-1, gp41 ВИЧ-1 группы O, gp36 ВИЧ-2 и антител к антигену p24 ВИЧ-1.	1 планшет	2 планшета	5 планшетов
Конъюгат-1 (концентрат) – смесь рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2, конъюгированных с биотином и антител к антигену p24 ВИЧ-1, конъюгированных с биотином. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость в стеклянном коричневом флаконе с желтой крышкой.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 3,5 мл
Конъюгат-2 (концентрат) - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость в стеклянном коричневом флаконе с белой крышкой.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 4,0 мл
РРК-1 (раствор для разведения конъюгата-1) - прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость в пластиковом бесцветном флаконе с бесцветной крышкой.	1 флакон 12,0 мл	1 флакон 12,0 мл	2 флакона по 15,0 мл
РРК-2 (раствор для разведения конъюгата-2) - прозрачная или слегка опалесцирующая синего цвета жидкость в пластиковом бесцветном флаконе с бесцветной крышкой.	1 флакон 20,0 мл	1 флакон 20,0 мл	2 флакона по 20,0 мл
K _{АТ} (контрольный положительный образец антител) – сыворотка (плазма) крови человека, содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, не содержащая антиген p24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием или смесь сыворотки крови человека, содержащей антитела к ВИЧ-1 и	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 5,0 мл

сыворотки крови иммунной козы, содержащей антитела к рекомбинантному антигену gr36 ВИЧ-2. Прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость в стеклянном бесцветном флаконе с красной крышкой.			
K ⁺ _{AG} (контрольный положительный образец антигена p24 ВИЧ-1) - очищенный рекомбинантный антиген p24ВИЧ-1 в сыворотке (плазме) крови человека, не содержащей антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к вирусу гепатита С, инаktivированной прогреванием. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость в стеклянном бесцветном флаконе с белой крышкой.	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 5,0 мл
K ⁻ (контрольный отрицательный образец) – сыворотка (плазма) крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1,2, антиген p24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инаktivированная прогреванием. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость в стеклянном бесцветном флаконе с зеленой крышкой.	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 4,0 мл	2 флакона по 5,0 мл
ПР (промывочный раствор) – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость в пластиковом бесцветном флаконе с бесцветной крышкой. Допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл	1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 120,0 мл
СБ - субстратный буферный раствор, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор водорода перекиси. Прозрачная бесцветная жидкость в пластиковом коричневом флаконе с коричневой крышкой.	1 флакон 25,0 мл	1 флакон 25,0 мл	3 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл
Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндегидро-хлорид. Прозрачная бесцветная жидкость (возможно наличие окраски) в стеклянном коричневом флаконе с синей крышкой.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость в пластиковом бесцветном флаконе с бесцветной крышкой.	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 25,0 мл	4 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл
Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт.	2 шт.	5 шт.
	2 шт.	4 шт.	10 шт.
Пластиковая скрепка или полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock для закрывания пакета с иммуносорбентом	1 шт.	2 шт.	3 шт.
Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.	4 шт.	10 шт.
Одноразовые наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов. Набор упакован в коробку картонную, куда вкладывается инструкция по применению.

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 или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифических компонентов (ПР, СБ), которые взаимозаменяемы во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора;
 - другие реагенты также могут быть взаимозаменяемыми для постановки в большинстве тест-систем производства ООО «НПО «Диагностические системы».
- за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7606, 7655) или по E-mail: info@npods.nnov.ru.
- 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 применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть водой дистиллированной, затем 70% раствором этилового спирта и ополоснуть водой дистиллированной.
- 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: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются, не допускать 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.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К⁻, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатита С и ВИЧ-1,2.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К^{+_{АТ}}, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатита С.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К^{+_{АГ}}, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатита С и ВИЧ-1,2.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.

- При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами необходимо 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.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать 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 канализацию. 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 дезинфекции – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твёрдые 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 дезинфекции – 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.

V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ 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.
- Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер (37,0 ± 1,0) °С.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-680 нм.
- Для постановки ИФА в автоматическом режиме - любая модель ИФА-анализаторов открытого типа (например, автоматический анализатор типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария).
- За более детальной информацией обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7606, 7655) или по E-mail: info@npods.nnov.ru.

VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведенную сыворотку или плазму. Образцы, содержащие видимые частицы следует осветлить центрифугированием, т.к. частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложно-положительным результатам. Образцы можно хранить в соответствии требованиями существующих нормативных документов. Во избежание осаждения фибрина плазму следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре (39,0 ± 1,0) °С на водяной бане. Сыворотку (плазму) нельзя размораживать при температуре выше 40 °С из-за нестабильности антигена р24 ВИЧ-1. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более 3-х раз. Нельзя использовать сыворотку (плазму) загрязненную или с гемолизом или гиперлипидемией.

Образцы, консервированные азидом натрия, анализу не подлежат!

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. Взять необходимое количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета или поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение срока годности при температуре от 2 до 8 °С.
- **К-** - контрольный отрицательный образец;
- **К⁺_{АТ}** - контрольный положительный образец антител;
- **К⁺_{АГ}** - контрольный положительный образец антигена;
- **РРК-1** - раствор для разведения конъюгата 1;
- **РРК-2** - раствор для разведения конъюгата 2;
- **Стоп-реагент 0,20 моль/л.**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- **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. 2, 3). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.
- **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 (см. табл. 2, 3). 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 в течение 12 ч при хранении в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С или в течение 1 месяца при хранении в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. В РРК-1 допустимо образование осадка.
- **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 (см. табл. 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 в течение 12 ч при хранении в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С или в течение 2-х недель в защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С. В РРК-2 допустимо образование осадка.
- **Субстратная смесь (СС).** Развести необходимый объем ТМБ соответствующим объемом СБ (см. табл. 2). Тщательно перемешать до полного растворения. Субстратную смесь готовить перед использованием. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

После вскрытия флаконов и пакета с иммуносорбентом, оставшиеся не использованными реагенты хранить в течение срока годности тест-системы.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

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

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата-1		Рабочий раствор конъюгата-2		СС	
	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	3,0	72,0	0,025	0,25	0,05	0,5	1,0	0,1
2	6,0	144,0	0,050	0,50	0,10	1,0	2,0	0,2
3	9,0	216,0	0,075	0,75	0,15	1,5	3,0	0,3
4	12,0	288,0	0,100	1,00	0,20	2,0	4,0	0,4
5	15,0	360,0	0,125	1,25	0,25	2,5	5,0	0,5
6	18,0	432,0	0,150	1,50	0,30	3,0	6,0	0,6
7	21,0	504,0	0,175	1,75	0,35	3,5	7,0	0,7
8	24,0	576,0	0,200	2,00	0,40	4,0	8,0	0,8
9	27,0	648,0	0,225	2,25	0,45	4,5	9,0	0,9
10	30,0	720,0	0,250	2,50	0,50	5,0	10,0	1,0
11	33,0	792,0	0,275	2,75	0,55	5,5	11,0	1,1
12	40,0	960,0	0,550	5,50	0,70	7,0	12,0	1,2

1. Во все лунки планшета внести по 30 мкл рабочего раствора конъюгата-1. Внесение в лунки планшетов рабочего раствора конъюгата-1 осуществлять **непосредственно перед добавлением** контрольных и исследуемых образцов. В зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется внести в лунки 70 мкл контрольных образцов следующим образом:

1-2 стрипа – K⁺_{AT} – 1 лунка, K⁺_{AT} – 1 лунка, K⁻ – 2 лунки;

3 стрипа и более – K⁺_{AT} – 1 лунка, K⁺_{AT} – 1 лунка, K⁻ – 3 лунки.

В зависимости от используемой автоматизированной системы возможно изменять порядок внесения и расположение контрольных образцов на планшете.

В остальные лунки внести по 70 мкл неразведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Время внесения образцов не должно превышать 15 мин (допускается предварительное внесение контрольных и тестируемых образцов в лунки планшета с последующим внесением конъюгата). При внесении образцов оранжевый цвет рабочего раствора конъюгата-1 должен измениться на розовый. При внесении образцов с кислым рН оранжевый цвет рабочего раствора конъюгата-1 может измениться на желтый. Некоторые образцы сывороток (плазм), имеющих рН близкий к нейтральному, после внесения цвет конъюгата-1 не меняют.

2. Возможны две процедуры инкубации планшета.

Процедура 1 (термошейкер):

2.1. После внесения образцов планшет выдержать 45 мин. в термошейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 1,0)°С.

2.2. **Не удаляя содержимого лунок и не промывая планшет**, во все лунки внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-2. При этом цвет содержимого лунок должен измениться на зеленый или фиолетовый. Планшет выдержать 20 мин в термошейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 1,0)°С.

Процедура 2 (термостат):

2.1. После внесения образцов содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, планшет накрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать 60 мин в термостате при температуре (37,0 ± 1,0)°С.

2.2. **Не удаляя содержимого лунок и не промывая планшет**, во все лунки внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-2. При этом цвет содержимого лунок должен измениться на зеленый или фиолетовый. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, планшет накрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

3. С помощью промывочного устройства содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 4 раза рабочим ПР, осторожно заполняя лунки до краев (не менее 400 мкл), выдерживая 40 с и удаляя промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет в течение 20 мин при температуре от 18 до 24 °С или в течение 15 мин при температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

5. 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 620-680 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Далее см. раздел IX.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

6. Проведение анализа в автоматическом режиме на анализаторе открытого типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постройка на других ИФА-анализаторах открытого типа).

Таблица 3

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов или на один планшет-иммуносорбент при постройке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Кол-во стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата-1		Рабочий раствор конъюгата-2		СС	
	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)
4 (только для комплекта 1)	16,0	384,0	0,4	4,0	0,45	4,5	7,0	0,7
8 (только для комплекта 1)	32,0	768,0	0,55	5,5	0,70	7,0	12,0	1,2
12 (целый планшет)	40,0	960,0	0,55	5,5	0,70	7,0	12,0	1,2

6.1. Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

6.2. Приготовленный рабочий промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость (входящую в комплект к ИФА-анализатору), остальные рабочие растворы и реагенты поместить в специальные контейнеры или емкости. Флаконы с контрольными образцами K^+_{AT} ,

K⁺_{АГ}, K⁻, а также флаконы или пробирки с образцами исследуемых сывороток в объеме не менее 300 мкл установить в соответствующие штативы анализатора. В анализатор поместить необходимое количество планшетов. Далее постановку проводить в соответствии с инструкцией по применению ИФА-анализатора и программой проведения ИФА.

6.3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов K⁺_{АГ}, K⁺_{АГ}, K⁻.

6.4. Далее учет результатов проводить аналогично п. 5 раздела VIII и разделу IX.

7. Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» на автоматических ИФА-анализаторах:

7.1. Контроль внесения конъюгата-1 и образцов сыворотки рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,450.

7.2. Контроль внесения конъюгата-2 рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,110.

7.3. Контроль внесения СС рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 0,050.

IX. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наличие определяемого ВИЧ антигена или антител к ВИЧ-1,2 оценивается сравнением оптической плотности (ОП), измеряемой для каждого образца, с расчетной величиной ОП критической.

Результаты анализа учитывать, если среднее значение ОП в 2 или 3 лунках с K⁻ (ОП K⁻_{ср}) не более 0,2, значение ОП в лунках с K⁺_{АГ} и с K⁺_{АГ} - не менее 0,8.

ОП крит. рассчитывать по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ОП K}^-_{\text{ср}} + A,$$

где A – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе.

Исследуемые образцы расценивать как положительные: если ОП ≥ ОПкрит.

Исследуемые образцы расценивать как отрицательные: если ОП < ОПкрит.

Образцы, значения ОП которых равны или превышают ОП крит., должны быть исследованы повторно в 2 лунках. При получении положительного результата хотя бы в одной из 2-х лунок образцы расценивать как положительные.

X. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности – 24 месяца. 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 и хранение при температуре до 25 °С 10 суток и до 30 °С 5 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.





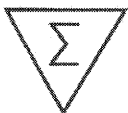

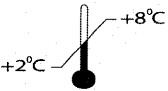



Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1. Рекламируемого набора.
2. Всех образцов кроводач пациента.

3. Протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности и фамилией оператора.

4. Протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности и фамилии оператора.

XI. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности число/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству

ООО «Научно-производственное объединение

«Диагностические системы»

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России

д.м.н, профессор



В.В. Долгов

Подпись В.В. Долгов
 удостоверяю:
 Специалист по кадрам РМАПО
 Подпись [Signature]
 "30" мая 2012 года

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bernard Weber. Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6:3, 2006.
2. Niel T. Constantine & Holly Zink. HIV Testing technologies after two decades of evolution. *Indian J Med Res* 121: 519-538, 2005.
3. Andre Tehe. Quantification of HIV-1 by a highly improved ELISA: An alternative to HIV-1 RNA based treatment monitoring in patients from Abidjan, Cote d' Ivoire. *Journal of Clinical Virology* 37: 199-205, 2006.
4. Ulf-Hakan Stenman. Immunoassay Standardization: Is It Possible, Who Is responsible, Who Is Capable. *Clinical Chemistry* 47: 815-820, 2001.
5. G.Stevens. Evaluation of Two Commercially Available, Inexpensive Alternative Assay Used for Assessing Viral Load in a Cohort of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C-Infected Patients from South Africa. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 857-861, 2005.
6. Feredoun Mahboudi. A serological screening assay of human immunodeficiency virus type 1 antibodies based on recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 125: 295-303, 2006.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН»**

Аналитическая чувствительность

Для оценки чувствительности набора реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» по выявлению антигена p24 ВИЧ-1 были использованы различные концентрации «HIV-1 ANTIGEN STANDARD» (BIO-RAD, Франция, кат. № 72217) и «HIV-1 p24 ANTIGEN 1st International Reference Reagent», NIBSC Code: 90/636. Как показано в таблице 1 предел чувствительности тест-системы при определении антигена p24 ВИЧ-1 – 0,5 IU/ml.

Таблица 1

Оценка чувствительности тест-системы «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН»

HIV- 1 ANTIGEN STANDARD (BIO – RAD)		HIV-1 p24 ANTIGEN 1 st international reference reagent	
пг/мл	ОП/ОП крит.	IU/ml	ОП/ОП крит.
80	10,8	4	11,0
40	5,2	2	5,4
20	2,7	1	2,9
10	1,2	0,5	1,4
5	0,6	0,25	0,7

Дополнительно аналитическая чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» была исследована при тестировании «HIV Antigen Sensitivity panel» (BBI PRA 801), в которой концентрация антигена ВИЧ-1 p24 была определена при использовании Du Pont Standard. Аналитическая чувствительность «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» составила 2.3 пг/мл.

Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» оценивалась при тестировании:

1. Образцов сывороток крови от 3276 пациентов, инфицированных ВИЧ-1 и 107 пациентов, инфицированных ВИЧ-2. Во всех случаях были получены положительные результаты (данные постановки контрольной лаборатории Paul-Ehrlich-Institut, Германия и ООО «НПО «Диагностические системы»). Чувствительность набора - 100%.
2. Референс панели сывороток крови человека, содержащих и не содержащих антитела против ВИЧ-1 (субтипы А, В, С) и ВИЧ-2 - ОСО 42-28-327-03П (ООО «Авиценна», Россия). Чувствительность набора с образцами данной панели – 100%.

3. Стандартной панели сывороток, содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) в различных концентрациях, «Стандарт ВИЧ-1 АТ(+)) по ТУ 9398-162-05941003-2010 - 100%.
4. Стандартной панели сывороток, содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека 2 типа (ВИЧ-2), «Стандарт ВИЧ-2 АТ(+)) по ТУ 9398-197-05941003-2011 - 100%.
5. Стандартного биологического материала, содержащему антиген р24 вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1), «Стандарт ВИЧ-1 АГ р24(+)) по ТУ 9398-103-05941003-2010– 10,0 пг/мл.
6. Панели «World Wide Performance Panel», WWRP 302 (М) (ВВИ, США), содержащей образцы группы ВИЧ-1 М (субтипы от А до G), один образец субтипа О, один рекомбинантный образец, три образца ВИЧ-2. Чувствительность набора с образцами данной панели – 100% (данные постановки контрольной лаборатории Paul-Ehrlich-Institut, Германия).
7. Панели «1st International Reference Panel for anti-HIV» (NIBSC, США, Код: 02/210). Чувствительность набора с образцами данной панели – 100% (данные постановки ООО «НПО «Диагностические системы»).
8. Панели «Anti-HIV 1/2 Combo Performance panel», PRZ206 (ВВИ, США). Чувствительность набора с образцами данной панели – 100% (данные постановки ООО «НПО «Диагностические системы»).
9. Панели «HIV 1 Incidence/Prevalence Performance panel», PRB601 (ВВИ, США). Чувствительность набора с образцами данной панели – 100% (данные постановки ООО «НПО «Диагностические системы»).
10. Панели «Anti-HIV 1 Mixed Titer Performance Panel», PRB204(М) (ВВИ, США). Чувствительность набора с образцами данной панели – 100% (данные постановки ООО «НПО «Диагностические системы»).
11. Панели «Anti-HIV 1/2 Qualification Panel», QRZ 761 (ВВИ, США). Чувствительность набора с образцами данной панели – 100% (данные постановки ООО «НПО «Диагностические системы»).
12. «Стандарт АТ(+)) ВИЧ-1» – стандартная панель сывороток (СПС), содержащая антитела к вирусу иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) в различных концентрациях (ЗАО «МБС», Россия) – 100%
13. «Стандарт АТ(+)) ВИЧ-2» - стандартная панель сывороток (СПС), содержащая антитела к вирусу иммунодефицита второго типа (ВИЧ-2) в различных концентрациях (ЗАО «МБС» Россия) – 100%.
14. Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 р24 – стандартная панель сывороток (СПС), содержащая антиген р24 вируса иммунодефицита человека первого типа (р24ВИЧ-1) в различных концентрациях (ЗАО «МБС» Россия) – 10,0 пг/мл.
15. 32 коммерческих сероконверсионных панелей (ВВИ и ZeptoMetrix, США). Полученные результаты представлены в таблице 2 (данные постановки контрольной лаборатории Paul-Ehrlich-Institut, Германия и ООО «НПО «Диагностические системы»).

Таблица 2

Диагностическая чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» при исследовании сероконверсионных панелей

№ п.п.	Панель	Количество положительных результатов по сравнению с количеством протестированных образцов	
		ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН	GENSCREEN ULTRA HIV Ag-Ab
1	ВВИ PRB931	5/9	4/9
2	ВВИ PRB939	4/9	3/9
3	ВВИ PRB942	1/4	1/4
4	ВВИ PRB948	2/4	1/4
5	ВВИ PRB916	3/6	3/6
6	ВВИ PRB941	4/6	4/6
7	ВВИ PRB930	4/4	4/4
8	ВВИ PRB952	4/6	4/6
9	ВВИ PRB949	2/5	2/5
10	ВВИ PRB929	5/7	5/7
11	ВВИ PRB951	4/6	4/6

12	BBI PRB944	5/6	4/6
13	BBI PRB934	3/3	3/3
14	BBI PRB947	3/4	3/4
15	BBI PRB940	8/8	7/8
16	BBI PRB960	2/9	2/9
17	BBI PRB961	2/9	2/9
18	BBI PRB962	2/6	2/6
19	BBI PRB963	2/7	2/7
20	BBI PRB964	1/6	1/6
21	BBI PRB965	5/6	5/6
22	BBI PRB966	3/10	3/10
23	ZMC HIV6240	7/13	6/13
24	ZMC HIV6244	3/15	3/15
25	ZMC HIV6245	6/11	6/11
26	ZMC HIV6247	4/10	4/10
27	ZMC HIV6246	9/21	8/21
28	ZMC HIV9079	17/25	17/25
29	ZMC HIV12008	6/13	5/13
30	ZMC HIV9077	17/28	17/28
31	ZMC HIV6243	3/9	NT
32	ZMC HIV9022	4/10	NT
	Итого:	150/295	135/276

Специфичность

Специфичность по результатам исследования, проведенного ОБТК ООО «НПО «Диагностические системы» на случайной выборке в количестве 5065 доноров составила 99,96%. По результатам внешних исследований на случайной выборке образцов сывороток (плазмы) в количестве 642658 (12 учреждений ЦСПИД, СПК, Центры крови) составила 99,83%.

Была протестирована панель из 5635 образцов сывороток крови пациентов, состоящая из:

- 182 образцов сывороток крови, содержащих антитела к возбудителям гепатита А, В, С, гриппа, пневмонии, тонзиллита, герпеса, цитомегаловирусной инфекции, сифилиса, хламидиоза;
- 55 образцов сывороток крови, содержащих ревматоидный фактор;
- 309 образцов сывороток, взятых от больных различными соматическими заболеваниями;
- 5090 образцов сывороток крови, взятых от беременных женщин.

14 образцов показали ложно-положительный результат с набором реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН»: 1 образец из группы больных инфекционными заболеваниями, 2 образца из группы больных соматическими заболеваниями, 11 образцов из группы беременных женщин. Специфичность набора составила – 99,75 %.

Специфичность набора «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» при использовании Стандартной панели сывороток, не содержащей антитела к вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1 «Стандарт ВИЧ-1,2 АТ(-), ВИЧ-1 АГ р24(-)» по ТУ 9398-161-05941003-2010 – 100%.

Специфичность набора «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» при использовании «Стандарт АТ(-)ВИЧ» - стандартная панель сывороток (СПС), не содержащая антитела к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1,2) и антигена р24 ВИЧ-1 (ЗАО «МБС» Россия) – 100%.

Точность

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 70 повторах на наборах реагентов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» одной и той же серии. Коэффициент вариации составил 6,8%.

Межсерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов в течение 3 дней 3 разными операторами. Коэффициент вариации составил 10,5%.

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 30 мкл рабочего раствора конъюгата-1
2	Внести	По 70 мкл K^{+}_{AT} , K^{+}_{AG} , K^{-}
3	Внести	По 70 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы)
4	Инкубировать	45 мин, $(37,0 \pm 1,0) ^\circ C$, 500 об/мин, термошейкер
		или 60 мин, $(37,0 \pm 1,0) ^\circ C$, термостат
5	Внести	По 50 мкл рабочего раствора конъюгата-2
6	Инкубировать	20 мин, $(37,0 \pm 1,0) ^\circ C$, 500 об/мин, термошейкер
		или 30 мин, $(37,0 \pm 1,0) ^\circ C$, термостат
7	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 400 мкл, 4 раза
8	Внести	По 100 мкл СС
9	Инкубировать	20 мин, 18-24 $^\circ C$, или 15 мин при $(37,0 \pm 1,0) ^\circ C$ в защищенном от света месте
10	Внести	По 150 мкл стоп-реактента
11	Учет результатов	450 нм/620-680 нм или 450 нм