

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

« 17 » 10 2006 г.

№ 01.11/168-06

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

«ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ-СПЕКТР»

**тест-система иммуноферментная для выявления суммарных антител к
отдельным белкам ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1
на основе рекомбинантных антигенов и моноклональных антител,
набор диагностический.**

Тест-система представляет собой диагностический набор, включающий следующие компоненты: иммуносорбент – полистироловые 96-луночные разборные планшеты, в лунках которых сорбированы рекомбинантные антигены, аналогичные белкам ВИЧ-1 - gp41, gp120, p24, p31; ВИЧ-1 группы О - gp41; ВИЧ-2 - gp36 и моноклональные мышинные антитела к антигену p24 ВИЧ-1, каждый антиген и моноклональные антитела сорбированы отдельно на двух стрипах планшета; K⁺_{АТ} (контрольный положительный образец) - смесь сывороток крови человека, содержащих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, или смесь сыворотки крови человека, содержащей антитела к ВИЧ-1, и сыворотки крови иммунной козы, содержащей антитела к рекомбинантному антигену gp36 ВИЧ-2, не содержащая HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инактивированная, жидкая; K⁺_{АГ} (контрольный положительный образец) – очищенный рекомбинантный антиген p24 ВИЧ-1 в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к ВИЧ-1,2, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инактивированный, жидкий; K⁻ (контрольный отрицательный

образец) - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1,2, антиген р 24 ВИЧ-1, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инактивированный, жидкий; конъюгат-1 – моноклональные мышинные антитела к антигену р24 ВИЧ-1, конъюгированные с биотином, лиофилизированный; конъюгат-2 – смесь рекомбинантных антигенов: ВИЧ-1 - gp41, gp120, p24, gp31, ВИЧ-1 группы О gp41, ВИЧ-2 - gp36, конъюгированных с биотином, лиофилизированный; конъюгат-3 – для выявления антигена – стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, лиофилизированный или жидкий (концентрат х 11); конъюгат-4 – для выявления антител – стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, лиофилизированный или жидкий (концентрат х 11); РРК-3 - раствор для разведения конъюгата-3; РРК-4 - раствор для разведения конъюгата-4; ПР - промывочный раствор (концентрат х 25) - для промывания иммуносорбента; СБ - субстратный буферный раствор; хромоген ТМБ, жидкий; стоп-реагент – раствор серной кислоты 0,20 моль/л.

Набор рассчитан на проведение 16 (2 x 8) определений антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1, включая контрольные. Возможно дробное 2-х разовое использование набора на протяжении срока годности.

Описание компонентов тест-системы: Иммуносорбент – разборный полистироловый 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками; На поверхность стрипов планшета с иммобилизованными антигенами и антителами нанесена цветная маркировка в виде колец, располагающихся по периферии лунок: на стрипах, предназначенных для определения антител к gp41 - кольца красного цвета, к gp120 - зелёного цвета, к p24 – синего цвета, к p31 - жёлтого цвета, к gp36 - чёрного цвета; на стрипах, предназначенных для определения антигена р24ВИЧ-1 – кольца белого цвета. Цветная маркировка может быть заменена этикетками или штампами с названием определяемых маркеров.

Конъюгат-1, лиофилизированный - сухая, пористая, аморфная масса зеленого цвета.

Конъюгат-2, лиофилизированный - сухая, пористая, аморфная масса оранжевого цвета.

Конъюгат-3, лиофилизированный - сухая, пористая, аморфная масса белого или светло-желтого цвета; или Конъюгат-3, жидкий (концентрат х 11) - прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло - желтого цвета жидкость.

Конъюгат-4, лиофилизированный - сухая, пористая, аморфная масса белого или светло-желтого цвета; или Конъюгат-4, жидкий (концентрат х 11) - прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло - желтого цвета жидкость.

K⁺_{AT} (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.

K⁺_{AG} (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.

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

РРК-3 - раствор для разведения конъюгата-3 - прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость.

РРК-4 - раствор для разведения конъюгата-4 - прозрачная или опалесцирующая синего цвета жидкость.

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

СБ - субстратный буферный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.

Хромоген ТМБ - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Тест-система предназначена для выявления суммарных антител к отдельным белкам ВИЧ-1 - gp41env (ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы O), gp120env, p24gag, p31pol, ВИЧ-2 - gp36env и выявления антигена p24 ВИЧ-1 в сыворотке (плазме) крови человека.

Чувствительность тест-системы при выявлении антигена p24 ВИЧ-1 – 5 пг/мл.

Меры безопасности

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

Способ применения тест-системы.

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

Перед использованием все компоненты набора тест - системы выдержать 30 мин при температуре от 20 до 24 °С.

Для отбора проб использовать калиброванные дозаторы пипеточные с погрешностью измерения не более 5 %.

1. Приготовление рабочих растворов.

Все растворы необходимо отбирать одноразовыми наконечниками!

Объёмы реагентов при проведении анализа на необходимом количестве стрипов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Таблица расхода реагентов тест-системы.

Количество используемых стрипов	ПР		СС	
	Рабочий промывочный раствор		ТМБ (мл)	СБ (мл)
	ПР (конц x 25) (мл)	Вода очищенная (мл)		
6	20,0	480,0	0,50	5,0
12	50,0	1200,0	1,00	10,0

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и развести в 25 раз водой очищенной. Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

После вскрытия флакона оставшийся неиспользованным концентрат промывочного раствора хранить во флаконе, плотно закупоренном пробкой

(закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

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

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным **К⁺_{АТ}** хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

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

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным **К⁺_{АГ}** хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

К⁻ - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным **К⁻** хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

РРК-3 - раствор для разведения конъюгата-3, готов к применению.

Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным **РРК-3** хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

РРК-4 - раствор для разведения конъюгата-4, готов к применению.

Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным **РРК-4** хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

Конъюгат-1, рабочий раствор - готовить перед использованием. Во флакон с лиофилизированным конъюгатом-1 добавить воду очищенную в объеме, указанном на этикетке, тщательно перемешать до полного растворения. Перед использованием выдержать не менее 10 мин.

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

Конъюгат-2, рабочий раствор - готовить перед использованием. Во флакон с лиофилизированным конъюгатом-2 добавить воду очищенную в объеме, указанном на этикетке, тщательно перемешать до полного растворения. Перед использованием выдержать не менее 10 мин.

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

Конъюгат-3, рабочий раствор - готовить перед использованием. Во флакон с лиофилизированным конъюгатом-3 добавить РРК-3 в объеме, указанном на этикетке, тщательно перемешать до полного растворения. При использовании жидкого конъюгата-3 из флакона с концентратом конъюгата отобрать 0,1 мл, перенести в чистый флакон и добавить 1,0 мл РРК-3, тщательно перемешать. Перед использованием рабочий раствор конъюгата выдержать не менее 10 мин.

Хранение: рабочий раствор конъюгата-3 хранить не более 6 часов в защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Конъюгат-4, рабочий раствор - готовить перед использованием. Во флакон с лиофилизированным конъюгатом-4 добавить РРК-4 в объеме, указанном на этикетке, тщательно перемешать до полного растворения.

При использовании жидкого конъюгата-4 из флакона с концентратом конъюгата отобрать 0,25 мл, перенести в чистый флакон и добавить 2,5 мл РРК-4, тщательно перемешать. Перед использованием рабочий раствор конъюгата выдержать не менее 10 мин.

Хранение: рабочий раствор конъюгата-4 хранить не более 6 часов в защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

СС - субстратная смесь - готовить перед использованием. Необходимое количество СБ перенести в одноразовую емкость, затем добавить необходимое количество ТМБ и тщательно перемешать.

Хранение: оставшиеся неиспользованными СБ и ТМБ хранить во флаконах, плотно закупоренных пробкой (закрытых винтовой крышкой), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

2. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником!** Отобранные образцы хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000 - 2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

Образцы, консервированные азидом натрия, анализу не подлежат!

3. Проведение ИФА (в соответствии с приведённой схемой внесения образцов).

При постановке ИФА рекомендовано использование термощейкера.

3.1. Перед проведением ИФА вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом со стороны пластиковой застежки, отступив 1,0 см. Взять

необходимое количество стрипов (6 или 12) и вставить их в рамку. Пакет с оставшимися стрипами тщательно закрыть пластиковой застежкой. Хранить при температуре от 2 до 8 °С на протяжении срока годности тест-системы.

3.2. Перед использованием иммуносорбент промыть 2 раза ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек и удалить промывочный раствор с помощью вошера в ёмкость с дезинфицирующим раствором.

3.3. В лунки планшета внести дозатором пипеточным по 25 мкл конъюгатов в рабочем разведении: в лунки стрипов 1-5 и 7-11 – конъюгат-2, в лунки стрипов 6 и 12 – конъюгат-1.

3.4. В соответствии со схемой внесения образцов в лунки 1-5 стрипов горизонтального ряда А внести по 25 мкл K^{+}_{AG} , в лунку 6 – го стрипа того же ряда внести 25 мкл K^{+}_{AG} . В лунки 1-6 стрипов горизонтальных рядов В и С внести по 25 мкл K^{-} . В остальные лунки 1-6 и 7-12 стрипов внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток. Каждый образец сыворотки внести в 6 лунок иммуносорбента в соответствии с приведённой схемой внесения образцов при постановке ИФА. **При внесении отрицательного контроля и исследуемых образцов сывороток в каждую из шести лунок иммуносорбента (см. схему внесения образцов) необходимо осторожно пипетировать содержимое каждой лунки и производить смену наконечника!**

(Смену наконечников необходимо производить во избежание контаминации стрипа для определения антигена р 24 и исследуемого образца конъюгатом-2, содержащим антиген р24, что приведет к ложноположительным результатам при выявлении антигена р24).

Схема внесения образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AT gp41	AT gp120	AT p24	AT p31	AT gp36	AG p24	AT gp41	AT gp120	AT p24	AT p31	AT gp36	AG p24
A	K ⁺ _{AT}	K ⁺ _{AT}	K ⁺ _{AT}	K ⁺ _{AT}	K ⁺ _{AT}	K ⁺ _{AG}	6	6	6	6	6	6
B	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	7	7	7	7	7	7
C	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	8	8	8	8	8	8
D	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9
E	2	2	2	2	2	2	10	10	10	10	10	10
F	3	3	3	3	3	3	11	11	11	11	11	11
G	4	4	4	4	4	4	12	12	12	12	12	12
H	5	5	5	5	5	5	13	13	13	13	13	13

После внесения сыворотки зеленый цвет конъюгата-1 должен измениться на серый (6 и 12 стрипы), оранжевый цвет конъюгата 2 – на розовый (1-5 и 7-11 стрипы). При тестировании плазмы или сыворотки, имеющих кислый рН, зеленый цвет конъюгата-1 и оранжевый цвет конъюгата-2 становится желтым. Некоторые образцы плазм, имеющих рН близкий к нейтральному, после внесения цвет конъюгатов не меняют.

После внесения образцов планшет выдержать 45 мин на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Возможна инкубация планшета в термостате при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч 30 мин.

3.5. Не удаляя содержимого лунок и не промывая планшет, в лунки 1-5 и 7-11 стрипов внести по 50 мкл конъюгата-4 в рабочем разведении, в лунки 6 и 12 стрипов внести по 50 мкл конъюгата-3 в рабочем разведении.

Конъюгаты 3 и 4 вносить с обязательной сменой наконечников и осторожным пипетированием содержимого лунок.

Планшет выдержать в течение 20 мин на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Возможна инкубация планшета в термостате при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

3.6. Содержимое лунок удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором и планшет промыть 8 раз ПР, как в п.п. 3.2. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета!

3.7. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл СС и выдержать планшет в течение 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 20 до 24 °С.

3.8. Реакцию остановить добавлением в лунки по 150 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин провести учет результатов.

4. Учет результатов

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

Результаты анализа учитывать, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с К- не более 0,2, в лунках с К⁺_{АТ}, К⁺_{АГ} - не менее 0,8. Учёт результатов анализа образцов сывороток на наличие антител к каждому антигену ВИЧ 1 и ВИЧ 2 и антигена р24 следует проводить отдельно. Результаты анализа следует считать положительными, если значение ОП исследуемого образца выше ОП крит.

ОП крит. рассчитывать по формуле:

ОП крит. АТ gp41= ср. знач. ОП К- (АТ gp41)+ А

ОП крит. АТ gp120= ср. знач. ОП К- (АТ gp120) + А

ОП крит. АТ р24= ср. знач. ОП К- (АТ р24) + А

ОП крит. АТ р31= ср. знач. ОП К- (АТ р31) + А

ОП крит. АТ gp36= ср. знач. ОП К- (АТ gp36) + А

ОП крит. АГ р24= ср. знач. ОП К- (АГ р24) + В,

где А и В – коэффициенты, установленные методом статистической обработки на предприятии-изготовителе, величины которых указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором тест-системы и в паспорте на серию данного препарата.

Критерии для интерпретации полученных результатов приведены в таблице 2

Таблица 2.

Рекомендуемые критерии для интерпретации результатов

«ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ-СПЕКТР»

АТ gp41	АТ gp120	АТ p24	АТ p31	АГ p24	АТ p36	Результат
+	+ 1 любой				-	положительный по ВИЧ 1
± 1 любой				+	-	положительный по ВИЧ 1*
-	-	±	±	-	+	положительный по ВИЧ 2
другие профили						неопределенный
-	-	-	-	-	-	отрицательный
*Примечание: при выявлении антигена p24 рекомендуется подтверждение результата в тест-системе «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ»						

Форма выпуска

Иммуносорбент – разборный планшет в пакете из плёнки многослойной.	1 шт.	
Конъюгат 1 (лиофилизированный) (объём растворителя указан на этикетке) – во флаконе	2 фл.	
Конъюгат 2 (лиофилизированный) (объём растворителя указан на этикетке) - во флаконе.	2 фл.	
Конъюгат 3 (лиофилизированный) (объём растворителя указан на этикетке) или жидкий (концентрат x 11) - во флаконе.	2 фл.	
	0,15 мл	1 фл.
Конъюгат 4 (лиофилизированный) (объём растворителя указан на этикетке) или жидкий (концентрат x 11) - во флаконе.	2 фл.	
	0,6 мл - 1 фл.	
К ⁺ _{АТ} , инактивированный - во флаконе.	0,5 мл - 1 фл.	
К ⁺ _{АГ} , инактивированный - во флаконе.	0,3 мл - 1 фл.	
К ⁻ , инактивированный - во флаконе.	1,0 мл - 1 фл.	
РРК-3 – во флаконе.	1,5 мл - 1 фл.	
РРК-4 – во флаконе.	7,0 мл - 1 фл.	
ПР (концентрат x 25) – во флаконе.	80,0 мл - 1 фл.	
СБ – во флаконе.	15,0 мл - 1 фл.	
ТМБ – во флаконе.	1,5 мл - 1 фл.	
Стоп-реагент – во флаконе.	15,0 мл - 1 фл.	
Рамка для стрипов.	1 шт.	

.Набор упакован в коробку из картона, в которую вложена инструкция по применению.

Условия хранения и транспортирования.

Транспортирование - в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С (допустимо транспортирование при температуре от 9 °С до 20 °С не более 7 суток). Замораживание не допускается.

Хранение - в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Хранить в недоступном для детей месте.

Срок годности - 18 месяцев

По истечении срока годности препарат использованию не подлежит.

Условие отпуска - для диагностики «in vitro». Только для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ГИСК им. Л. А. Тарасевича по адресу 119002, г. Москва, Сивцев Вражек, д. 41, телефон 241-39-22 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603022, Россия, Нижний Новгород, ул. Барминская, 8а, тел: (8312) 786 716, 786 717 и 343 454, факс: (8312) 343 318.

Генеральный директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы» д. м. н., профессор



А. Н. Бурков

Руководитель государственных
испытаний, д. м. н., профессор

М. С. Воробьева