

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	5
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	7
11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	7
12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	7
13. ПОКАЗАТЕЛИ ПРАВИЛЬНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.	8
14. ЛИТЕРАТУРА	8

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К ВИРУСАМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА I И II ТИПОВ (ВИЧ I, II) ВИЧ
I ГРУППЫ 0 И АНТИГЕНА p24 ВИЧ I В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ
«антиВИЧ I(0), II/p24-ИФА»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «антиВИЧ I(0), II/p24-ИФА» предназначен для одновременного выявления антител к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антигена p24 ВИЧ I в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относят к семейству ретровирусов (Retroviridae), роду лентивирусов (Lentivirus). Название lentivirus происходит от латинского lente - медленный. Такое название отражает одну из особенностей вирусов этой группы, а именно - медленную и неодинаковую скорость развития инфекционного процесса в макроорганизме. Для лентивирусов также характерен длительный инкубационный период.

1.3. После заражения ВИЧ хронологическая последовательность появления в сыворотке (плазме) специфических маркеров, идентифицирующих инфекцию, является следующей: вирусная РНК, антиген p24 и антитела против ВИЧ. Точный момент времени, когда могут быть выявлены вирусная РНК, антиген p24 или антитела, зависит от нескольких факторов: методики исследования, индивидуального ответа организма и т.д. Вирусная РНК может выявляться с помощью метода ПЦР в самой начальной стадии заболевания, антиген p24 - уже через 2 недели после заражения и оставаться в количественных концентрациях течение 3-5 мес. Методы нового поколения для выявления специфических антител к ВИЧ позволяют получить надежный результат у большинства инфицированных приблизительно через 3-4 недели после инвазии (серологически латентный период, когда наличие ВИЧ-инфекции невозможно выявить с помощью анализов на антитела). Методы, выявляющие антиген p24, сокращают этот период на 1-2 недели. Выявление ВИЧ-инфекции на ранней стадии позволяет в ранние сроки начать специфическую антиретровирусную терапию, консультирование и своевременно начать противоэпидемические мероприятия.

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Выявление антител к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антигена p24 ВИЧ I основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы: рекомбинантный антиген gr41 ВИЧ-1, рекомбинантный антиген gr36 ВИЧ-2 и моноклональные антитела к антигену p24 ВИЧ-1. В лунки планшета добавляется смесь высокоочищенных рекомбинантных антигенов gr41, gr36 и моноклональные антитела к антигену p24 ВИЧ I, конъюгированные с биотином (конъюгат В), контрольные сыворотки и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (Конъюгат А). В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию специфических антител к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антигена p24 ВИЧ I. Содержание антител к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антигена p24 ВИЧ I в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови рассчитывается по формуле, приведенной в Инструкции по применению.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность.

При проверке на стандартной панели предприятия {СПП № 112SP «Сыворотки крови человека, не содержащие специфические антитела к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антиген р24 ВИЧ I для проверки диагностической специфичности», утвержденной генеральным директором ООО «ХЕМА» 11.01.2010 г., ООО «ХЕМА», Россия}, состоящей из 750 нативных образцов сыворотки и плазмы крови человека, достоверно не содержащих специфические антитела к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антиген р24 ВИЧ I, диагностическая специфичность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» составляет 99,5%.

При проверке на стандартной панели сывороток, не содержащих антитела к ВИЧ-1,2 и антигену р24 ВИЧ-1 «Стандарт АТ(-) ВИЧ» (ЗАО «Медико-Биологический Союз», Россия, кат. № INS-20, СОС 42-28-214-02П, зарегистрирован в РФ, РУ № ФСР 2007/00953) диагностическая специфичность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» составляет 100%.

При проверке на контрольной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ-1,2 «Контроль АТ(+/-) ВИЧ-1,2» (ЗАО «Медико-Биологический Союз», Россия, кат. № IBS-8, зарегистрирован в РФ, РУ № ФСР 2007/00953) диагностическая специфичность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» составляет 100%.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов выявления антител к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антигена р24 ВИЧ I в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Наборов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» (внутрисерийный и межсерийный) не превышает 8,0%.

3.3. Чувствительность.

При проверке на панели сывороток, содержащих антиген р24 ВИЧ-1 в различных концентрациях «АГ(+) ВИЧ-1 р24» (ЗАО «Медико-Биологический Союз», Россия, кат. № IPS-10-1, СОС 42-28-375-05, зарегистрирован в РФ, РУ № ФСР 2007/00953) аналитическая чувствительность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» не превышает 5,0 пг/мл.

При проверке на контрольной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ-1,2 «Контроль АТ(+/-) ВИЧ-1,2» (ЗАО «Медико-Биологический Союз», Россия, кат. № IBS-8, зарегистрирован в РФ, РУ № ФСР 2007/00953) диагностическая чувствительность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» составляет 100%.

При проверке на стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-2 в различных концентрациях «Стандарт АТ(+) ВИЧ-2» (ЗАО «Медико-Биологический Союз», Россия, кат. № IBS-8-2, СОС 42-28-216-02, зарегистрирован в РФ, РУ № ФСР 2007/00953) диагностическая чувствительность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» составляет 100%.

При проверке на стандартной панели предприятия {СПП № 112SS «Сыворотки крови человека, содержащие специфические антитела к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и антиген р24 ВИЧ I для проверки диагностической чувствительности», утвержденной генеральным директором ООО «ХЕМА» 11.01.2010 г., ООО «ХЕМА», Россия}, состоящей из 540 нативных образцов сыворотки и плазмы крови человека, достоверно содержащих специфические антитела к вирусам иммунодефицита человека I и II типов (ВИЧ I, II) ВИЧ I группы 0 и/или антиген р24 ВИЧ I, диагностическая чувствительность Набора реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» составляет 100%.

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P112Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN112Z-1	CONTROL -	Отрицательная контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, не содержащая антиген р24 ВИЧ I и антитела к ВИЧ I, II; готова к использованию (3.0 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
3	CP112Z CP112Z-2	CONTROL Ab+ CONTROL Ag+	Положительные контрольные сыворотки на основе сыворотки крови человека, содержащие специфические антитела к ВИЧ I, II и высокоочищенный рекомбинантный антиген р24 ВИЧ I соответственно, готовы к использованию (по 1.0 мл каждая*)	2	шт	прозрачная жидкость синего цвета и прозрачная жидкость красного цвета соответственно
4	T112XZ	CONJ 11X	Концентрат Конъюгата B (1.1 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
5	ST112Z	DIL CONJ	Буфер для разведения концентрата Конъюгата B, готов к использованию (12 мл)	1	шт	прозрачная жидкость зеленого цвета
6	B112Z	CONJ-BIOTIN	Конъюгат A, готов к использованию (4.0 мл)	1	шт	прозрачная синего зеленого цвета
7	R055XZ	TMB	ТМБ-хромоген, концентрат (3.0 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	S055XZ	SUBS BUF	Субстратный буфер (12 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
9	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (50 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
10	R050Z	STOP	Стоп-реагент, готов к использованию (12 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
11	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-

* CONTROL Ag+ лиофилизирован

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Положительные контрольные сыворотки CONTROL Ag+ и CONTROL Ab+ и отрицательная контрольная сыворотка CONTROL- инактивированы прогревом при + 50 °С в течение 3,5 ч.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450–620 (680) нм;
- орбитальный термостатируемый шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600–800 об/мин, поддерживающий температуру +37 °С ±0,1 °С
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (например, 1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

7.4. Приготовление конъюгата В.

Приготовьте конъюгат В: для этого разбавьте концентрат конъюгата В (CONJ 11X) в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата В (DIL CONJ). ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата В не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата В, которая необходима для данной постановки!

Пример: на 1 стрип (8 лунок) требуется 880 мкл конъюгата: 80 мкл концентрата конъюгата В + 800 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата В.

7.5. Приготовление раствора субстрата ТМБ

Приготовьте раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ): для этого разбавьте ТМБ-хромоген (ТМВ) в 34.4 раза Субстратным буфером (SUBS ТМБ). ВНИМАНИЕ! Раствор субстрата ТМБ не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата ТМБ-хромогена, которая

необходима для данной постановки! Раствор субстрата ТМБ должен быть бесцветным!

Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 1030 мкл раствора субстрата ТМБ: 30 мкл концентрата ТМБ-хромоген + 1000 мкл Субстратного буфера.

ВНИМАНИЕ! концентрат ТМБ-хромоген перед использованием следует выдержать при комнатной температуре (от +25...+28 °С) в течение 30 минут. При температуре ниже +20 °С возможно образование кристаллов.

7.6. Приготовление положительной контрольной сыворотки, содержащей высокоочищенный рекомбинантный антиген р24 ВИЧ I (CONTROL Ag+)

Добавьте во флакон с CONTROL Ag+ 1 мл бидистиллированной воды и тщательно перемешайте до полного растворения.

Хранить при +4...+8 °С в течение 5 дней. Для более длительного хранения рекомендуется замораживать ниже -20 °С в аликвотах.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «антиВИЧ I(0), II/р24-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого Набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 47 исследуемых образцов и 3 пробы контрольных сывороток (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
 - Конъюгат А, концентрат конъюгата В, Буфер для разведения концентрата конъюгата В, ТМБ-хромоген, стоп-реагент Субстратный буфер после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
 - контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев (кроме CONTROL Ag+)
 - оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.
 - приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;
- Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку (плазму) крови.

Допускается однократное замораживание при -20 °С исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

8.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов — исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (2 лунки для CONTROL- и по одной лунке каждого CONTROL+).
2	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 70 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 70 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
3	Внесите во все лунки по 30 мкл Конъюгата А (CONJ-BIOTIN).
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600 об/мин.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 300 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Требуется задержка при отмывке (замачивание лунок) 30 секунд. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	Приготовьте конъюгат В: для этого разбавьте концентрат конъюгата В (CONJ 11X) в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата В (DIL CONJ). ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 880 мкл конъюгата: 80 мкл концентрата конъюгата В + 800 мкл Буфера для разведения концентрата конъюгата В.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата В.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 10 минут при температуре +37 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600 об/мин
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 7 раз. (см. п. 9.5)
10	Приготовьте раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ): для этого разбавьте ТМБ-хромоген (ТМБ) в 34.4 раза Субстратным буфером (SUBS ТМБ). ВНИМАНИЕ! Раствор субстрата ТМБ не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата ТМБ-хромогена, которая необходима для данной постановки! Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 1030 мкл раствора субстрата ТМБ: 30 мкл концентрата ТМБ-хромоген + 1000 мкл Субстратного буфера.
11	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2—3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при температуре +37 °С в течение 10 минут.
12	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
13	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм и референс светофильтре 620–680 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1	Рассчитайте среднюю ОП Отрицательной контрольной сыворотки CONTROL-; $\text{ОП (CN112Z)}_{\text{Ср}} = (\text{ОП1 (CN112Z)} + \text{ОП2 (CN112Z)} + \text{ОП3 (CN112Z)}) / 3$
2	Результаты анализа считать достоверными, если - ОП Положительного контроля CONTROL Ab+ не ниже 1.5 оптических единиц (ОЕ) - ОП Положительного контроля CONTROL Ag+ не ниже 0.3 оптических единиц (ОЕ) - ОП Отрицательного контроля не выше 0.1 ОЕ - ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения отрицательного контроля, т.е. $\text{ОП (CN112Z)}_{\text{Ср}} \times 0.5 < \text{ОПn (CN112Z)} < \text{ОП (CN112Z)}_{\text{Ср}} \times 2.0$ если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN112Z)Ср
3	Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.05

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1	При ОП образца < Cut off – образец отрицательный. При ОП образца > Cut off – образец положительный, При ОП образца = Cut off – образец неопределенный. Такие образцы следует исследовать повторно в двух лунках. При получении положительного результата хотя бы в одной лунке образцы считать положительными.
---	--

По вопросам, касающимся качества Набора «**антиВИЧ I(0), II/p24-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
 105043, Москва, а/я 58, тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)
 электронная почта: rqc@xema.ru; info@xema.ru
 интернет: www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
 к. б. н. Д. С. Кострикин