

Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г.Минск, ул.академика Купревича, 5, корп.3
Факс (017) 211-80-19

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА P24 И АНТИТЕЛ
К ВИРУСУ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА
ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

**ИФА-ВИЧ 1/2 АГ-АТ
Набор Т1-12**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ А.С.Романенков
" 00 " 00 2006 г.

ИФА-ВИЧ 1/2 АГ-АТ – набор реагентов иммуноферментный четвертого поколения для одновременного определения антител, специфических к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ 1/2), и корового антигена ВИЧ – p24.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для скрининговых и подтверждающих исследований сыворотки и плазмы крови человека на наличие корового антигена ВИЧ – p24 и суммарных антител IgA, IgM, IgG, специфических к ВИЧ 1/2.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора

Иммуносорбент	1 планшет
Положительная контрольная сыворотка АТ (К ⁺ АТ)	1 ампл., 1,4 мл
Положительная контрольная сыворотка АГ (К ⁺ АГ)	1 ампл., 1,4 мл
Отрицательная контрольная сыворотка (К ⁻)	2 ампл. по 2,0 мл
Концентрат конъюгата №1	1 ампл., 0,8 мл
Концентрат конъюгата №2	1 ампл. по 1,5 мл
Раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (раствор ТМБ)	1 фл., 7,0 мл
Концентрат раствора для промывания планшета (КРП)	2 фл. по 25,0 мл
Раствор для разведения конъюгата №1 (РПК №1)	1 фл., 8,0 мл
Раствор для разведения конъюгата №2 (РПК №2)	1 фл., 15,0 мл
Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 7,0 мл
Стоп-реагент	1 фл., 15,0 мл

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-ВИЧ 1/2 АГ-АТ" – иммуносорбент и иммуноферментные конъюгаты.

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, лунки которого сенсibilизированы моноклональными антителами к антигену ВИЧ p24 и рекомбинантными полипептидами – аналогами антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (env-1, env-2).

Иммуноферментные конъюгаты представляет собой биотинилированные поликлональные антитела к коровому антигену ВИЧ p24, рекомбинантные антигены env-1, env-2, конъюгированные с пероксидазой хрена (конъюгат №1) и пероксидазный конъюгат стрептавидина (конъюгат №2).

При внесении в лунки планшета конъюгата №1 и образцов сывороток инфицированной крови антиген p24 связывается как со специфическими антителами на твердой фазе, так и с поликлональными биотинилированными анти-p24 антителами, входящими в состав конъюгата №1; ВИЧ-специфические антитела связываются как с рекомбинантными антигенами env-1, env-2, сорбируемыми на твердой фазе, так и с антигенами, входящими в состав конъюгата №1, образуя комплексы антиген-антитело. Иммуные комплексы анти-p24 специфических антител и антигена p24 выявляются конъюгатом №2 стрептавидина с пероксидазой.

После отмывания несвязанных компонентов, в лунки планшета добавляют раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5М раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) в лунках в двухволновом режиме (при длине волны 450/620 нм). Интенсивность окраски в лунках определяется присутствием ВИЧ-специфических антител и/или антигена p24 в образцах сыворотки или плазмы крови.

2.3 Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Рекомбинантные антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях E.coli и содержащиеся в наборе "ИФА-ВИЧ 1/2 АГ-АТ" являются биологически безопасными. Однако присутствие в наборе некоторых биологических компонентов, источником которых является человек (положительные и отрицательные контрольные сыворотки), химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с обработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты в соответствии с требованиями [1], [2];
- не пипетировать растворы ртом;
- все жидкие отходы необходимо обрабатывать раствором с массовой долей перекиси водорода 6% при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и затем автоклавировать в течение 1 ч при температуре 120 °С;
- инструменты и оборудование, а также рабочие поверхности, на которых проводился анализ, необходимо до и после работы протирать в течение нескольких секунд раствором с объемной долей этилового спирта 70° либо другими синтетическими средствами вируцидного действия.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

**5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

5.1 Фотометр типа "Multiskan EX" для измерения оптической плотности;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 5,000 мл (от 20 до 5000 мкл);
- пипетки 8-ми каналные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,03 до 0,3 мл (от 30 до 300 мкл);
- суховоздушный термостат на 42°С;
- цилиндры мерные вместимостью 25 и 1000 мл;
- стаканы мерные вместимостью 100, 1000 мл;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки хирургические резиновые;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 8 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-25)°С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета

Если КРП содержит кристаллы, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37)°С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 2 мл концентрата в мерной стакан вместимостью 100 мл, добавить 60 мл дистиллированной воды и перемешать раствор стеклянной палочкой в течение (40-60) с.

Неиспользованный КРП можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

Раствор для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8)°С не более 5 сут.

6.3 Приготовление раствора конъюгата №1

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата №1 готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 0,5 мл (500 мкл) РРК №1 (синий цвет), добавить 0,05 мл (50 мкл) концентрата конъюгата №1 (синий цвет). Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

РРК №1 и остаток концентрата конъюгата №1 после вскрытия упаковки можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

6.4 Приготовление раствора конъюгата №2

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата №2 готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 1,0 мл (100 мкл) РРК №2 (красный цвет), добавить 0,1 мл (100 мкл) концентрата конъюгата №2 (красный цвет). Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

РРК №2 и остаток концентрата конъюгата №2 после вскрытия упаковки можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

6.5 Приготовление проявителя

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 0,5 мл (500 мкл) СБР, добавить 0,5 мл (500 мкл) раствора ТМБ и интенсивно перемешать смесь в течение (20-30) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором проявителя, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

СБР и раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

6.6 Положительные и отрицательная контрольные сыворотки готовы к использованию.

После вскрытия упаковки растворы можно хранить при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности.

6.7 Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флакона раствор можно хранить при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности.

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,2-0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- необходимо выдерживать лунки заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение одного месяца.

8.2 Приготовить раствор для промывания планшета (п.6.2) и раствор конъюгата №1 (синий цвет) (п.6.3).

8.3 В лунку А-1 внести 0,1 мл (100 мкл) К⁺ АТ. В лунку В-1 внести 0,1 мл (100 мкл) К⁺ АГ. В лунки С-1, D-1, E-1 внести по 0,1 мл (100 мкл) К⁻. В остальные лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) образцов исследуемых сывороток.

8.4 Во все лунки планшета поверх контролей и образцов внести по 0,03 мл (30 мкл) раствора конъюгата №1. Планшет установить на автоматический встряхиватель, и перемешать содержимое лунок (при малой амплитуде встряхивания) в течение (15-20) с.

8.5 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 42 °С в течение 60 мин.

8.6 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 6 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.7 Приготовить раствор конъюгата №2 (красный цвет) (п.6.4).

8.8 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата №2.

8.9 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при комнатной температуре (18-25)°С в течение 15 мин.

8.10 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 6 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п.8.6).

8.11 Приготовить раствор проявителя (п.6.5).

8.12 В каждую лунку планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя.

8.13 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25)°С в защищенном от света месте в течение 30 мин.

8.14 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента.

8.15 Не позже чем через 1 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в двухволновом режиме при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

ВНИМАНИЕ! Возможно измерение ОП в одноволновом режиме при длине волны 492 нм относительно пустой лунки (бланк). Для этого необходимо предусмотреть пустую лунку при постановке анализа. При работе в одноволновом режиме снижается чувствительность и точность анализа.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с К⁻ – ОПср (К⁻).

9.2 Результаты учитываются только при соблюдении следующих условий:

ОПср (К⁻) не должно превышать 0,15 ОЕ;

ОП (К⁺ АТ) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

ОП (К⁺ АГ) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

Если одно из трех значений ОП (К⁻) больше 0,15 ОЕ или более чем в два раза превышает ОПср (К⁻), (то есть, не отвечает требованию 0,5 x ОПср (К⁻) ≤ ОП (К⁻) ≤ ОПср (К⁻) x2) его отбрасывают и ОПср (К⁻) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (К⁻).

9.3 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить граничное значение ОП (ГЗ) по формуле (1) и параметры "серой зоны":

$$ГЗ = ОПср (К⁻) + 0,2 \quad (1),$$

где 0,2 – константная величина.

"Серая зона" – зона значений ОП, находящаяся в промежутке от ГЗ до значений меньших ГЗ на 10%.

9.4. Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП "серой зоны".

9.5. Результаты считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ.

9.6. Образцы со значениями ОП в пределах "серой зоны" считаются неопределенными.

9.7. Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках набора: образцы положительные в одной или больше лунках, следует считать положительными; образцы отрицательные в двух и более лунках, следует считать отрицательными.

9.8. Все образцы, которые при повторном анализе проявили себя как положительные, должны быть проверены подтверждающими методами.

10. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА

10.1. Набор выпускается в трех вариантах комплектации:

набор Т2 – 2 монолитных планшета. Набор рассчитан на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок). Набор рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли.

набор Т1-12 – 1 стриповый планшет. Набор рассчитан на проведение 12 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли.

набор Т24 – 2 стриповых планшета. Набор рассчитан на проведение 24 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Набор рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

11.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

11.3 Срок годности набора – 1 год.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

