



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Факс (37517) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО И
ВТОРОГО ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ
И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ИФА-ВИЧ 1/2
Набор Т12 стрип**

Утверждена министерством здравоохранения Республики Беларусь
28.09.2007 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для первичного определения антител к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов в сыворотке и плазме крови человека.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

| Наименование компонента | Количество |
|---|----------------|
| 1 Концентрат раствора для промывания планшетов (КРП) | 3 фл. по 25 мл |
| 2 Иммуносорбент | 2 планшета |
| 3 Конъюгат | 1 мкпр; 0,45мл |
| 4 Раствор для разведения конъюгата (РРК) | 1 фл., 20 мл |
| 5 Субстратный буферный раствор (СБР) | 1 фл., 14 мл |
| 6 Хромоген ТМБ (ТМБ) | 1 фл., 14 мл |
| 7 Положительная контрольная сыворотка (K ⁺) | 1 мкпр; 0,8 мл |
| 8 Отрицательная контрольная сыворотка (K ⁻) | 1 мкпр; 1,8 мл |
| 9 Стоп-реагент | 1 фл., 25 мл |

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-ВИЧ 1/2" – иммуносорбент и конъюгат. Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого сорбированы рекомбинантные полипептиды – аналоги антигенов ВИЧ-1: env 1 (gp 120, gp 41), gp 1 (p24, p17) и ВИЧ-2: env-2 (gp 36). Конъюгат представляет собой смесь рекомбинантных полипептидов – аналогов белков ВИЧ-1 (env 1, gp 1) и ВИЧ-2 (env-2), конъюгированных с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета конъюгата и образцов исследуемых сывороток, ВИЧ-специфические антитела связываются как с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, так и с антигенами конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело.

После отмывания несвязанных компонентов, в лунки планшета добавляют раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5М раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) в лунках (при длине волны 450 нм), которая пропорциональна концентрации ВИЧ-специфических антител в образцах сыворотки или плазмы крови.

2.3 Набор рассчитан на проведение 192 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" являются биологически безопасными. Однако 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.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями приказов МЗ РБ № 66 и № 351. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями ОСТ 42-21-2-85.

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

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. Собранные 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 чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден 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 постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;

- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,030 до 0,400 мл (от 30 до 400 мкл);

- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);

- суховоздушный термостат на 37 °С;

- мерный цилиндр вместимостью 20 и 1000 мл;

- стакан мерный вместимостью 500 мл;

- ванночки для реагентов;

- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;

- клейкая пленка или крышка;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые хирургические;

- вода дистиллированная;

- контейнер для сбора твердых отходов;

- контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 16 лунок)

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

6.2 Приготовление промывочного раствора

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

6.2.2 Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть, отобрать 6 мл в мерный стакан вместимостью 500 мл, добавить 270 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 10 суток.

6.3 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отобрать 1,5 мл РРК и добавить 0,03 мл (30 мкл) конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор готовят непосредственно перед использованием!

6.4 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон внести 1,0 мл хромогена ТМБ и добавить 1,0 мл СБР. Закрывать флакон крышкой и тщательно перемешать смесь в течение (20-30) с.

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

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 (0,300 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- выдержать лунки с промывочным раствором в течение 40-60с; - удалить раствор из лунок.

По окончании промывания планшета, удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! Необходимо строго придерживаться правил промывания планшета, согласно п.7.

8.1 Приготовить КРП согласно п.6.2.

8.2 Приготовить раствор конъюгата согласно п.6.3.

8.3 Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку.

Неиспользованные стрипы необходимо плотно закрыть в пакете и использовать в течение 1 месяца. Неиспользованные стрипы хранят при температуре (2-8) °С.

8.4 В каждую лунку внести по 0,060 мл (60 мкл) раствора конъюгата (п.6.3).

8.5 В лунки внести по 0,030 мл (30 мкл) образцов исследуемых сывороток, оставив свободными 5 лунок первого ряда.

В две лунки (A_1 , B_1) внести по 0,030 мл (30 мкл) положительной контрольной сыворотки (K^+).

В три лунки (C_1 - E_1) внести по 0,030 мл (30 мкл) отрицательной контрольной сыворотки (K^-).

ВНИМАНИЕ! При внесении сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках. Во время пипетирования происходит изменение цвета раствора в лунках.

8.6 Накрывать планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 90 мин.

8.7 После окончания инкубации удалить раствор реагентов из лунок планшета и промыть лунки восемь раз промывочным раствором (п.6.2).

После последней аспирации удаляют влагу, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.8 Приготовить раствор проявителя, согласно п.6.4.

8.9 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя, накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать в темном месте при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

8.10 Остановить цветную реакцию внесением во все лунки по 0,100 мл (100 мкл) раствора стоп-реагента.

8.11 Не позже чем через 5 мин после остановки цветной реакции определить оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме - 450 нм относительно 620 нм.

Как исключение, ОП можно определять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе. При работе в одноволновом режиме снижается чувствительность и точность анализа.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с отрицательной контрольной сывороткой (ОПср (K^-)) и для лунок с положительной контрольной сывороткой (ОПср (K^+)).

Проведение анализа в тест-системе считается корректным, если ОПср (K^-) не выше 0,1 оптической единицы (ОЕ), а ОПср (K^+) не ниже 0,6 ОЕ.

Если одно из трех значений ОП (K^-) больше 0,1 ОЕ или больше чем в два раза превышает ОПср (K^-), его не учитывают и ОПср (K^-) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (K^-).

9.2 Граничное значение ОП (ГЗ)

ГЗ рассчитывают, добавляя константную для данной серии наборов величину 0,1 к значению ОПср (K^-).

9.3 "Серая зона" – зона значений ОП, которая находится 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 двух вариантах комплектации:

1 Набор Т2 – монолит: монолитный планшет; набор рассчитан на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: одна постановка – один планшет (96 лунок).

2 Набор Т12 – стрип: стриповый планшет; набор рассчитан на проведение 12 постановок иммуноферментного анализа: одна постановка – один стрип (16 лунок).

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

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

Замораживать набор запрещается.

11.3 Срок годности набора – 1 год.