УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
СП ООО «Фармлэнд»
_____ Г.В.Макеев
«12» 12 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ И АНТИГЕНА Р24 ВИЧ-1 В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА **«ИФА-HIV 1,2 AGAT»**

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для одновременного выявления антител к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антигена р24 ВИЧ-1 в сыворотке и плазме крови человека “in vitro” методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	2 планшета
Положительный контрольный образец АТ **($К^+$АТ)**	1 флакон, 3 мл
Положительный контрольный образец АГ **($К^+$АГ)**	3 флакона, лиофилизованный препарат
Отрицательный контрольный образец **($К^-$)**	2 флакона по 3 мл
Раствор конъюгата №1 **(РК-1)**	1 флакон, 12 мл
Конъюгат №2 **(Кг-2)**	1 флакон, 1 мл
Раствор для разведения конъюгата №2 **(РР-К2)**	2 флакона по 18 мл
Раствор конъюгата № 2 (РК-2)	2 флакона по 18 мл
Буферный раствор для субстрата **(БРС)**	2 флакона по 18 мл
Хромоген ТМБ	1 флакон, 1 мл
Раствор хромогена (РХ)	2 флакона по 18 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином **(ФСБ-Т×25)**	2 флакона по 50 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 12 мл
Комплект ванночки для реагентов с наконечниками для многоканальных пипеток	1 комплект
Клейкая пленка	6 штук

2.2 Основные компоненты набора " ИФА-HIV 1,2 AGAT " – иммуносорбент, раствор конъюгата №1 и конъюгат №2.

Иммуносорбент представляет собой полистироловый планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 (gp41) и ВИЧ-2 (gp36) и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ-1.

Раствор конъюгата №1 представляет собой смесь меченых биотином моноклональных человеческих антител против антигена р24 ВИЧ-1 и меченых биотином рекомбинантных белков ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

Конъюгат №2 представляет собой стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена.

Положительный контрольный образец АТ – сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, не содержащая антитела к вирусу гепатита С и Treponema pallidum, антиген р24 ВИЧ-1 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Положительный контрольный образец АГ – сыворотка крови человека содержащая нативный антиген р24 ВИЧ-1, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и Treponema pallidum и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антиген р24 ВИЧ-1 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Принцип работы набора. При внесении в лунки планшета раствора конъюгата №1 и образцов сывороток инфицированной крови антиген р24 связывается как со специфическими антителами на твердой фазе, так и с моноклональными биотинилированными анти-р24 антителами, входящими в состав раствора конъюгата №1; ВИЧ-специфические антитела связываются как с рекомбинантными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2, сорбированными на твердой фазе, так и с антигенами, входящими в состав раствора конъюгата №1, образуя комплексы антиген-антитело. Иммунные комплексы анти-р24 специфических антител и антигена р24 выявляются конъюгатом №2. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена ТМБ.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,9 М раствор серной кислоты), и интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Величина ОП прямо пропорциональна концентрации специфических антител и/или антигена р24 в образце сыворотки или плазмы. Чем выше содержание антител и/или антигена р24 в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение на проведение **24 постановок** ИФА: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок). Всего – **192 определений**, включая контрольные образцы.

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сыворотки (плазмы) крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными 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 и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], и [3].

3.2 Стоп-реагент, содержащий серную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

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

3.4 Все лица, работающие в лаборатории с наборами, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

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, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение (5-10) мин при скорости вращения 3000 об/мин. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут. Замороженные образцы (желательно до температуры не менее минус 20 °С) можно хранить не более 1 года. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным ростом, 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;
- всю используемую для приготовления реагентов посуду не обрабатывать дезрастворами и моющими средствами. В случае необходимости промыть водой питьевой проточной, а затем пять раз ополоснуть дистиллированной водой;
- для работы с хромогеном ТМБ и РХ необходимо использовать отдельные емкости для растворов, наконечники для пипеток, посуду.
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с. Не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для раствора для промывания планшета и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста;
- необходимо использовать пипетки автоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором с объемной долей спирта этилового 70 %. Не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- для работы с исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.
- при внесении в лунки РК-1 нельзя касаться наконечником пипетки поверхности планшета и раствора, находящегося в лунках.
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

4.2 При вскрытии и растворении лиофилизованных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- суховоздушный термостат типа ТС-80 М2, поддерживающий температуру (37±1) °С, или аналогичный ему по характеристикам;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 до 5,0 мл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,5 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 2000 мл;
- колба лабораторная вместимостью 2000 мл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70 %;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода деионизированная или дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре **(18-25) °С в течение 30 мин**.

Все образцы сывороток (плазмы) и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

Расход реагентов набора для постановки анализа, который определяется количеством используемых стрипов, приведен в таблице 1.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета

Внимание! Раствор для промывания планшета готовить за 15 мин до начала проведения анализа!

Если флакон с ФСБ-Т×25 содержит осадок, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (37±1) °С до полного растворения осадка. В мерный цилиндр вместимостью 2000 мл внести содержимое флакона с ФСБ-Т×25, затем добавить дистиллированной воды до метки **1250 мл** и аккуратно перемешать раствор. Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 72 ч.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с ФСБ-Т×25 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимый объем раствора (таблица А.1) в мерный стакан или цилиндр, добавить необходимое количество дистиллированной воды и перемешать раствор. Неиспользованный ФСБ-Т×25 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.3 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев.

6.4 Подготовка $К^+$АТ, $К^-$, РК-1, РР-К2, БРС и стоп-реагента

$К^+$АТ, $К^-$, РК-1, РР-К2, БРС и стоп-реагент готовы к использованию.

Внимание! Во флаконе с РК-1 возможно выпадение осадка. Для проведения анализа необходимо использовать надосадочную жидкость.

Неиспользованные РК-1, РР-К2, БРС и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Остаток $К^+$АТ и $К^-$ после вскрытия флакона можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.5 Приготовление раствора $К^+$АГ

Внимание! Раствор $К^+$АГ готовить за 15 мин до начала проведения анализа!

Для восстановления лиофилизированного $К^+$АГ перед вскрытием флакона легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флакона или пробки. Открыть флакон и положить пробку перевернутой на сухую поверхность. Внести во флакон 0,8 мл дистиллированной воды. Флакон закрыть пробкой, выдержать в течение 10 мин при температуре (18-25) °С и аккуратно наклоняя и вращая флакон, перемешать его содержимое до полного растворения, избегая образования пены.

Восстановленный $К^+$АГ можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение одного месяца, при температуре минус 20 °С – в течение шести месяцев. Допускается однократное замораживание-оттаивание восстановленного $К^+$АГ.

6.6 Приготовление раствора Кг-2 в рабочем разведении

Из флакона с Кг-2 отобрать указанный в таблице А.1 объем и перенести во флакон с РР-К2. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в чистый флакон отобрать необходимое количество РР-К2, добавить Кг-2 в соответствии с таблицей А.1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Раствор Кг-2 в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор Кг-2 в рабочем разведении можно хранить в течение 15 мин при температуре (18-25) °С. Использовать только новую ванночку для реагентов и новые наконечники!

Остаток Кг-2 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.7 Приготовление рабочего раствора субстрата

Если флакон с хромогеном ТМБ содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (37±1) °С до полного растворения кристаллов.

Из флакона с хромогеном ТМБ отобрать указанный в таблице А.1 объем и перенести во флакон с БРС. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в чистый флакон отобрать необходимое количество БРС, добавить хромогена ТМБ в соответствии с таблицей А.1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Рабочий раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор можно хранить в течение 20 мин при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Остаток хромогена ТМБ можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

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;
- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;
- необходимо выдерживать лунки, заполненными раствором для промывания планшета, в течение 30 с;
- при каждой аспирации тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 В любые две лунки планшета внести по **0,1 мл** (100 мкл) **$К^+АТ$**, в две другие лунки– по **0,1 мл** (100 мкл) **$К^+АГ$**, в три другие лунки – по **0,1 мл** (100 мкл) **$К^-$**.

Внимание! При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для $К^-$ - две лунки, для $К^+АТ$ – одну лунку, для $К^+АГ$ – одну лунку.

В остальные лунки планшета внести по **0,1 мл** (100 мкл) исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека.

Внимание! Каждый образец необходимо отбирать одноразовым наконечником!

8.2 Во все лунки планшета поверх контрольных образцов и исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови **сразу** внести по **0,05 мл** (50 мкл) **РК-1**. Содержимое лунок перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.

8.3 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 60 мин**.

Внимание! За (1-2) мин до окончания инкубации приготовить раствор Кг-2 в рабочем разведении (п 6.6).

8.4 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.2) **семь раз.**

8.5 Внести во все лунки планшета по **0,15 мл** (150 мкл) раствора **Кг-2** в рабочем разведении (п 6.6).

8.6 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин**.

8.7 Удалить содержимое лунок планшета с помощью промывателя, затем промыть лунки планшетов раствором для промывания планшета (п 6.2) **семь раз.**

8.8 Во все лунки планшета внести по **0,15 мл** (150 мкл) **рабочего раствора субстрата** (п 6.7).

8.9 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в защищенном от света месте в течение 25 мин**.

Внимание! По окончании инкубации в лунках с образцами сывороток, содержащими антитела к ВИЧ-1 и/или ВИЧ-2, и/или антиген р24 ВИЧ-1, произойдет изменение окраски раствора от бесцветной до голубой различной интенсивности в зависимости от концентрации антител и/или антигена в исследуемом образце сыворотки.

8.10 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по **0,05 мл** (50 мкл) **стоп-реагента**.

Внимание! В лунках с образцами сывороток, содержащими антитела к ВИЧ-1 и/или ВИЧ-2, и/или антиген р24 ВИЧ-1, произойдет изменение окраски раствора с голубой на желтую различной интенсивности.

8.11 Не позже чем через (1-2) мин после остановки реакции определить ОП в лунках в одноволновом режиме при длине волны **450 нм**.

9 Обработка результатов анализа

9.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с $К^-$ – ОПср $К^-$, ОЕ; для лунок с $К^+АТ$ – ОПср $К^+АТ$, ОЕ; для лунок с $К^+АГ$ – ОПср $К^+АГ$, ОЕ.

9.2 Результаты учитывать только в том случае если:

- значение ОПср $К^-$ не превышает 0,2 ОЕ;
- каждое отдельное значение ОП $К^-$ не должно отклоняться от ОПср $К^-$ более чем на 30%. Если одно из трех значений ОП $К^-$ выходит за этот предел, его следует исключить из расчета ОПср $К^-$. Если два из трех значений ОП $К^-$ выходят за этот предел, анализ следует повторить на реагентах нового набора;
- значение ОПср $К^+АТ$ более 1,0 ОЕ;
- значение ОПср $К^+АГ$ более 1,0 ОЕ.

9.3 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить критическое значение (ОПкрит.), ОЕ, по формуле (1):

$$ОПкрит. = ОПср\ К^- + \mathbf{0,16} \quad (1).$$

Результат теста считать **положительным** при анализе на данном наборе реагентов, если значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека **равно или больше** значения **ОПкрит**.

Результат теста считать **отрицательным** при анализе на данном наборе реагентов, если значение ОП исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека **меньше** значения **ОПкрит**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10 Условия хранения и применения набора

10.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. Запрещается замораживать компоненты набора.

10.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.3 Срок годности набора – **12 месяцев**.

Таблица 1 – Расход реагентов набора для постановки ИФА

Объем реагента, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление раствора для промывания планшета												
ФСБ-Т×25	**4**	**8**	**12**	**16**	**20**	**24**	**28**	**32**	**36**	**40**	**44**	**50**
Дистиллированная вода	**до 100**	**до 200**	**до 300**	**до 400**	**до 500**	**до 600**	**до 700**	**до 800**	**до 900**	**до 1000**	**до 1100**	**до 1250**
Приготовление раствора Кг-2 в рабочем разведении												
РР-К2	**1,3**	**2,7**	**4,0**	**5,3**	**6,6**	**8,0**	**9,3**	**10,6**	**12,0**	**13,3**	**14,6**	**16,0**
Кг-2	**0,033**	**0,068**	**0,100**	**0,133**	**0,165**	**0,200**	**0,230**	**0,270**	**0,300**	**0,330**	**0,370**	**0,400**
Приготовление рабочего раствора субстрата												
БРС	**1,3**	**2,7**	**4,0**	**5,3**	**6,6**	**8,0**	**9,3**	**10,6**	**12,0**	**13,3**	**14,6**	**16,0**
Хромоген ТМБ	**0,033**	**0,068**	**0,100**	**0,133**	**0,165**	**0,200**	**0,230**	**0,270**	**0,300**	**0,330**	**0,370**	**0,400**

Библиография

[1] Санитарные правила
СП 17-69 РБ 98 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 № 18

[2] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165
О проведении дезинфекции и стерилизации учреждениями здравоохранения

[4] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.04.2010 г. № 47
Об утверждении Инструкции о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих и признании утратившими силу некоторых постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 «Правила обращения с медицинскими отходами»

Изготовитель СП ООО «Фармлэнд» Почтовый адрес: 220113 г. Минск, ул. Восточная, 129. Тел\факс (017) 3733190
По вопросам применения и качества набора обращаться на предприятие-изготовитель СП ООО «Фармлэнд».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru