

Сентябрь 2014 г.

Murex HIV Ag/Ab Combination

Комбинированная иммуноферментная тест-система для одновременного выявления антигена ВИЧ и выявления сероконверсии к вирусу иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы O) и к ВИЧ 2 типа в сыворотке и плазме крови человека

Тест-система предназначена для индивидуальной проверки доноров на наличие антигена р24 ВИЧ, а также антител к ВИЧ-1, включая группу O, и ВИЧ-2 или для помощи в диагностировании ВИЧ-инфекции.

Обслуживание заказчиков

Для получения дополнительной информации связывайтесь с местной организацией, обслуживающей заказчиков.

Перед использованием следует внимательно прочитать данную инструкцию по применению. Следует тщательно соблюдать данную инструкцию по применению. Надежность результатов анализа не гарантируется в случае любых отклонений от инструкции по применению.

IVD

Используемые символы

	Регистрационный номер		Медицинское устройство для диагностики <i>In Vitro</i>
	Номер партии		Хранить при температуре 2-8°C
	Годен до		ВНИМАНИЕ! См. сопроводительные документы
	Производитель		См. инструкцию по применению

Полное описание символов, используемых для обозначения компонентов набора реагентов, см. в разделе **РЕАГЕНТЫ**.

НАЗНАЧЕНИЕ

Комбинированная иммуноферментная тест-система для одновременного выявления антигена ВИЧ и выявления сероконверсии к вирусу иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы O) и к ВИЧ 2 типа в сыворотке и плазме крови человека.

Тест-система предназначена для индивидуальной проверки доноров на наличие антигена p24 ВИЧ, а также антител к ВИЧ-1, включая группу O, и ВИЧ-2 или для помощи в диагностировании ВИЧ-инфекции.

РЕЗЮМЕ И ОПИСАНИЕ ТЕСТА

Синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) вызывается двумя типами вируса иммунодефицита человека: ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Оба являются ретровирусами и передаются с некоторыми биологическими жидкостями организма, преимущественно с кровью и генитальными секретами, а также трансплацентарно. ВИЧ-1 распространен по всему миру; ВИЧ-2 обнаруживается в основном в Западной Африке и некоторых странах Европы.¹

Показана существенная антигенная перекрестная реактивность белков gag и pol двух типов вирусов, в то время как перекрестная реактивность гликопротеинов оболочки отмечается реже.

При скрининге с целью выявления антител к обоим типам вируса на всех стадиях инфекции важно кроме основных перекрестно реагирующих белков gag и pol, анализировать эпитопы белков оболочки обоих вирусов.^{2,3} У пациентов из Камеруна и Европы были обнаружены варианты ВИЧ-1, объединенные в группу O.^{4,5} Вирусы группы O сильно отличаются от описанных первоначально подтипов ВИЧ-1 (относящихся к группе M). Для выявления антител к вирусу группы O у инфицированных индивидов могут использоваться специфические эпитопы оболочки вируса этой группы; перекрестная реактивность с другими подтипами ВИЧ не значима.⁶ В ответ на инфицирование ВИЧ возникает реакция образования специфических антител: вначале иммуноглобулинов M (IgM), а в последующем – иммуноглобулинов G (IgG).⁷ Максимальная чувствительность в выявлении сероконверсии антител к ВИЧ достигается в таких анализах, в которых определяются как IgM, так и IgG, ядерный антиген обычно обнаруживается кратковременно перед появлением антител.

В анализе Murex HIV Ag/Ab Combination выявляется ядерный антиген ВИЧ, а также IgG, IgM и IgA к гликопротеину оболочки и перекрестно реагирующим белкам pol ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Анализ позволяет идентифицировать потенциально инфицированные образцы сыворотки крови и плазмы крови с ЭДТА или цитратом.

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

В анализе Murex HIV Ag/Ab Combination используются микрочайки, покрытые синтетическим пептидом, представляющим иммунодоминантные участки ВИЧ-1 (O) и ВИЧ-2, рекомбинантным белком, полученным из белков оболочки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, белком pol ВИЧ и моноклональными антителами к p24 ВИЧ-1. Конъюгат представляет собой смесь эпитопов тех же антигенов и различных моноклональных антител, в том числе и к p24, меченных пероксидазой хрена.

Образцы и контрольная сыворотка инкубируются в ячейках; реактивный ядерный антиген ВИЧ и/или антитела к ВИЧ из образца или контрольной сыворотки связываются с антителами и/или антигенами на микрочайках. Затем проводится промывание для удаления образца и оставшихся антител. На последующем этапе добавляется конъюгат, который, в свою очередь, связывается с реактивным ядерным антигеном ВИЧ и/или специфическими антителами, ранее связавшимися с реагентами на ячейках. В образцах, не содержащих реактивного ядерного антигена или специфических антител, связывания конъюгата с ячейкой не происходит.

После промывания для удаления несвязанного конъюгата в ячейки добавляется раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. В ячейках со связавшимся конъюгатом появляется сине-зеленое окрашивание, которое сменяется на оранжевое после добавления серной кислоты для остановки реакции. Интенсивность окрашивания оценивается спектрофотометрически при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ

ОПИСАНИЕ, ПОДГОТОВКА К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

См. также **Меры предосторожности**.



Если не указано иного, все компоненты должны храниться при температуре 2-8°C. В этих условиях активность сохраняется в течение всего срока годности набора.

COATED WELLS

1. Ячейки, покрытые антигеном

1 плашка (7G79-09) или 5 плашек (7G79-11), содержащие по 96 ячеек, покрытых антигеном ВИЧ и моноклональными антителами.

Перед извлечением ячеек из упаковки дайте им достичь комнатной температуры (18-30°C).

Неиспользованные ячейки поместите в прилагаемый закрывающийся пакет для хранения и поместите в холодильник (2-8°C).

SAMPLE DIL

2. Разбавитель образца

1 флакон, содержащий 8 мл (7G79-09) или 18 мл (7G79-11) буфера зеленого/коричневого цвета, содержащий бычий и мышинный белки, детергент и сапонин. Консервант: ProClin® 300, 0,05%.

CONJUGATE

3. Конъюгат

1 флакон (7G79-09) или 3 флакона (7G79-11), содержащих по 1,1 мл лиофилизированных антигенов ВИЧ и моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. После восстановления содержимое одного флакона рассчитано на 2 плашки.

CONJUGATE DIL

4. Разбавитель конъюгата

1 флакон (7G79-09) или 3 флакона (7G79-11), содержащих по 22 мл раствора желтого цвета, состоящего из буфера, бычьего белка, сапонина и детергента. Содержимое 1 флакона рассчитано на восстановление 1 флакона конъюгата. Консервант: ProClin® 300, 0,1%.

Восстановление конъюгата

Для полного удаления конъюгата, скопившегося под резиновой крышкой, аккуратно постучите флаконом по столу. Перелейте все содержимое флакона с разбавителем конъюгата во флакон с конъюгатом, закройте его крышкой и перемешайте его содержимое, аккуратно переворачивая. Оставьте флакон не менее чем на 30 минут, иногда взбалтывая содержимое. Восстановленный конъюгат имеет красную окраску. Если необходимо, восстановленный конъюгат можно перелить обратно в пластиковые флаконы из-под разбавителя конъюгата.

Восстановленный конъюгат можно хранить при температуре 2-8°C до 4 недель.

CONTROL 1 + !

5. Положительная контрольная сыворотка к антителами к ВИЧ-1

1 флакон, содержащий 1,7 мл инактивированной сыворотки крови человека в буфере с бычьим белком. Консервант: Bronidox®, 0,05%.

CONTROL 2 + !

6. Положительная контрольная сыворотка к антителами к ВИЧ-2

1 флакон, содержащий 1,7 мл инактивированной сыворотки крови человека в буфере с бычьим белком. Консервант: Bronidox®, 0,05%.

CONTROL p24 +

7. Положительный контроль с p24 ВИЧ-1

1 флакон, содержащий 1,7 мл рекомбинантного антигена p24 в буфере с бычьим белком. Консервант: Bronidox®, 0,05%.

CONTROL - !

8. Отрицательный контроль

2 флакона, содержащих по 2,5 мл нормальной сыворотки крови человека, разбавленной буфером с бычьим белком. Консервант: Bronidox®, 0,05%.

SUBSTRATE DIL

9. Разбавитель субстрата

1 флакон, содержащий 35 мл бесцветного раствора тринатриевой соли цитрата и перекиси водорода.

SUBSTRATE CONC

10. Концентрат субстрата

1 флакон, содержащий 35 мл раствора оранжевого цвета: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и стабилизаторы.

Приготовление раствора субстрата

Приготовьте раствор субстрата в чистом стеклянном или пластиковом сосуде, добавив бесцветный разбавитель субстрата к равному количеству оранжевого концентрата субстрата.

Очень важно соблюдать этот порядок смешивания и следить, чтобы все используемые пипетки и контейнеры были чистыми. Кроме того, раствор субстрата можно приготовить, перелив все содержимое флакона с разбавителем субстрата во флакон с концентратом субстрата. 1 флакон раствора субстрата рассчитан как минимум на 5 плашек – см. **таблицу 1**.

Таблица 1
Необходимый объем концентрата субстрата и разбавителя субстрата

Кол-во ячеек											Кол-во плашек			
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	96	1	2	3	4
Концентрат субстрата (мл)														
0,5	1,0	2,0	2,5	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	4,5	6,0	6	12	18	22
Разбавитель субстрата (мл)														
0,5	1,0	2,0	2,5	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	4,5	6,0	6	12	18	22

При использовании автоматической системы может понадобиться дополнительное количество реагентов. Не допускайте попадания прямых солнечных лучей. Раствор субстрата должен быть бледно-желтым; если он имеет зеленый цвет, необходимо вылить его и приготовить свежий раствор.

Приготовленный раствор субстрата из этого набора и растворы из других наборов Murex, в которых используется концентрат субстрата оранжевого цвета, могут быть взаимозаменяемы. Проверьте, чтобы раствор субстрата был приготовлен из разбавителя субстрата и концентрата субстрата из одного набора.

Приготовленный раствор субстрата сохраняет стабильность при хранении в холодильнике (2-8°C) или при 15-25°C в течение не более 2 суток; при выпадении кристаллов раствор необходимо выбросить.

WASH FLUID

11. Промывочная жидкость

1 (7G79-09) или 2 (7G79-11) флакона, содержащих по 125 мл 20-кратного концентрата промывочной жидкости (глицин/борат). Консервант: Bronidox®, 0,2%.

Разведите промывочную жидкость дистиллированной или деионизированной водой в соотношении 1:19 для получения необходимого количества раствора или разведите все содержимое одного флакона промывочной жидкости до 2500 мл. Концентрат промывочной жидкости может содержать кристаллы; они растворятся после разведения до рабочей концентрации. Разведенная промывочная жидкость содержит консервант Bronidox® в концентрации 0,01%.

Промывочная жидкость из этого набора и промывочные жидкости из других наборов Murex, содержащие глицин/борат, могут быть взаимозаменяемы.

Промывочную жидкость в рабочем разведении храните при температуре 18-30°C в закрытом сосуде, при этих условиях она сохраняет свои свойства в течение 1 месяца.

ПРИМЕЧАНИЕ. При хранении промывочная жидкость может стать желтого цвета. Это не влияет на качество анализа при условии полной аспирации промывочной жидкости из ячеек.

ПРИМЕЧАНИЕ. Несмотря на то что можно использовать раствор субстрата и промывочную жидкость из других наборов, не используйте их по истечении сроков годности, указанных на этикетках их компонентов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**IVD**

Реагенты предназначены только для диагностики *in vitro*.

Только для профессионального использования.

Следуйте рекомендациям производителя и информации на этикетках по использованию потенциально опасных компонентов.

В контролях из набора может наблюдаться осадок фибрина в небольшом количестве, что не влияет на качество изделия. Это продукт некоторых партий сыворотки, использовавшихся для изготовления контролей.

ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ

ВНИМАНИЕ. В этом наборе содержатся компоненты, полученные от человека.

Образцы сыворотки крови человека, использовавшиеся для изготовления компонентов набора, были протестированы на наличие следующих анализатов (**таблица 2**).

Таблица 2

Компонент	Реактивен на	Не реактивен на
Отрицательный контроль	H/P	HBsAg, антитела к HCV, ВИЧ-1 и ВИЧ-2
Положительный контроль 1	Антитела к ВИЧ-1	HBsAg
Положительный контроль 2	Антитела к ВИЧ-2	HBsAg

Помимо этого, образцы сыворотки человека, используемые для положительного контроля, также тестируются на антитела к вирусу гепатита С (HCV) и могут быть реактивными.

Все реактивные образцы сыворотки перед приготовлением из них реагентов набора были инактивированы. Однако все материалы человеческого происхождения должны считаться потенциально инфицированными. С набором реагентов и образцами пациентов рекомендуется обращаться с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики.

Согласно Регламенту ЕС 1272/2008 (CLP) опасные реагенты классифицируются и маркируются следующим образом:

Реагенты:	CONJUGATE DIL	SAMPLE DIL	CONJUGATE *
Классификация:	Skin sens. 1 H317		
Сигнальное слово:	Предупреждение		
Символы / пиктограммы:			
Предупреждения об опасности:	H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию.		
Предупреждения о мерах предосторожности:	P280 Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/средства защиты глаз или лица. P363 Стирайте загрязненную одежду, прежде чем использовать ее повторно. P333+P313 При появлении раздражения кожи или сыпи: Обратитесь за медицинской помощью/консультацией.		
Содержит:	Реакционная масса: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-она [ЕС номер 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-она [ЕС номер 220-239-6] (3:1).		
* В восстановленном конъюгате содержится 0,1% препарата ProClin® 300, который считается опасным по классификации Регламента ЕС 1272/2008.			

Реагенты:	SUBSTRATE CONC
Классификация:	Eye Irrit. 2 H319
Сигнальное слово:	Предупреждение
Символы / пиктограммы:	
Предупреждения об опасности:	H319 Вызывает серьезное раздражение глаз
Предупреждения о мерах предосторожности:	P264 После обращения с продуктом тщательно вымойте руки P280 Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/средства защиты глаз или лица. P305+P351+P338, ЕСЛИ В ПЛАЗАХ: Осторожно промойте водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они имеются и сделать это легко. Продолжайте промывать.

Согласно Регламенту ЕС 1272/2008 (CLP) WASH FLUID обозначается маркировкой «EUN210 Паспорт безопасности предоставляется по требованию». Дополнительную информацию см. в паспортах безопасности на веб-сайте www.diasorin.com

1. Потенциально контаминированные материалы следует утилизировать с соблюдением местных правил.
2. Капли пролитых потенциально инфицированных материалов нужно немедленно промокнуть впитывающей бумажной салфеткой и перед продолжением работы протереть зону загрязнения 1,0%-ным раствором гипохлорита натрия.⁸ Следы кислотосодержащих жидкостей нельзя обрабатывать гипохлоритом натрия, пока зона загрязнения не вытерта насухо.
Материалы, использованные для вытирания пролитой жидкости, в том числе перчатки, следует утилизировать с соблюдением правил для потенциально биологически опасных материалов. Материалы со следами гипохлорита натрия нельзя автоклавируют.
3. Нейтрализованные кислоты и другие жидкие отходы обеззараживают путем добавления гипохлорита натрия в конечной концентрации, равной как минимум 1,0%. Для эффективного обеззараживания может потребоваться обработка 1,0%-ным раствором гипохлорита натрия в течение 30 минут.
4. Не пипетируйте ртом. При работе с образцами и проведении анализа используйте одноразовые перчатки и защитные средства для глаз. После завершения работы тщательно мойте руки.
5. При попадании любого реагента на кожу или в глаза немедленно промойте их большим количеством воды.
6. Серная кислота, необходимая для получения стоп-раствора, и соляная кислота, используемая для промывания стеклянной посуды, являются едкими веществами. При обращении с ними соблюдайте соответствующие меры безопасности. При попадании этих кислот на кожу или в глаза тщательно промойте их водой.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ВО ВРЕМЯ АНАЛИЗА

1. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности. Не допускайте бактериального загрязнения реагентов, что может приводить к уменьшению срока годности продукта и получению ошибочных результатов анализа.
2. Не отступайте от порядка **Процедуры анализа** и не используйте реагенты других производителей или из других наборов, если не указано, что они являются взаимозаменяемыми. Не уменьшайте рекомендуемое время инкубации.
3. Все реагенты и образцы перед использованием должны быть комнатной температуры (18-30°C). Сразу после применения верните их в рекомендуемые для хранения условия.
4. Стеклопосуду, в которую наливали реагенты, необходимо тщательно промыть соляной кислотой (2M), а затем дистиллированной или деионизированной водой высокого качества.
5. Не используйте для хранения реагентов и образцов саморазмораживающуюся морозильную камеру.
6. Не допускайте воздействия на реагенты яркого света или паров гипохлорита в процессе хранения или инкубации.
7. Во время процедуры анализа не допускайте высыхания ячеек.
8. Не допускайте перекрестной контаминации реагентов. Пипетка для переноса раствора субстрата в анализах Murex должна быть надписана. Кроме того, должна быть надписана пипетка для переноса конъюгата.
9. Разбавитель образца, используемый в этом анализе, может вызывать ложно-положительные результаты в анализах на антитела к поверхностному антигену гепатита В (anti-HBs) в случае

перекрестной контаминации.

Если тест Murex HIV Ag/Ab Combination выполняется вместе с анализом anti-HBs на аппарате с фиксированным наконечником, исключите возможность перекрестной контаминации в процессе валидации.

10. Не трогайте и не допускайте попадания брызг на край ячейки с конъюгатом. Не выдувайте содержимое из пипетки; рекомендуется по мере возможности использовать обратное пипетирование.
11. Перед началом анализа проверьте, чтобы дно плашки было чистым и сухим, а на поверхности жидкости не было пузырьков.
12. Не допускайте попадания в микроячейки порошка с одноразовых перчаток.
13. При работе с полностью автоматическими анализаторами
 - i) не обязательно использовать крышки для плашек и высушивать ячейки;
 - ii) не позволяйте жидкостям из системы попадать в образцы или реагенты;
 - iii) необходимо исключить возможность перекрестной контаминации между анализами при валидации анализов на полностью автоматических анализаторах.
14. Убедитесь, что температурные условия во время анализа соответствуют требованиям протокола анализа.
15. Не используйте CO₂-инкубатор.
16. Не храните стоп-раствор в неглубокой посуде или переливайте его обратно во флакон после использования.
17. Необходимо исключить возможность перекрестной контаминации между анализами при валидации протоколов анализов на аппаратуре.

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

СБОР ОБРАЗЦОВ

Для анализа можно использовать образцы сыворотки крови или плазмы крови с ЭДТА или цитратом. Проверьте, чтобы в образцах сыворотки свертывание было полным. При наличии любых видимых взвешенных частиц удалите их путем центрифугирования. В случае подготовки образцов с использованием антикоагулянтов, например плазмы с цитратом, следует учитывать эффект разбавления.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы следует хранить при температуре 2-8°C. Если анализ образца не будет проведен в течение 72 часов, его нужно отделить от сгустков и конгломерата клеток и хранить замороженным (при температуре -15°C или более низкой). Многократного замораживания и размораживания образцов необходимо избегать. После размораживания перед анализом образцы нужно тщательно перемешать.

ПРОЦЕДУРА

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

1. **Стоп-раствор (серная кислота, от 0,5M до 2M)**, например, добавьте от 3,0 мл (для получения 0,5M) до 11 мл (для 2,0M) концентрированной серной кислоты аналитической чистоты (18M) к 80 мл дистиллированной или деионизированной воды, а затем, добавив еще воды, доведите общее количество до 100 мл. Кроме того, можно использовать следующий реагент: серная кислота, 1N (Код N0164 - упаковка с 15 флаконами, и N0165 - упаковка с 1 флаконом).
2. **Свежая дистиллированная или деионизированная вода высокого качества** необходима для разведения промывочной жидкости, для приготовления стоп-раствора и использования в автоматических промывателях.
3. **Одно- и многоканальные микропипетки** необходимых объемов.
4. **Инкубатор**, поддерживающий температуру, указанную в протоколе анализа.
5. **Нагревательный блок** (кат. № 5F09-02). Для использования в инкубаторах. Лучше всего держать нагревательный блок в инкубаторе, в котором он применяется. Если же это невозможно, помещайте блок в инкубатор как минимум за 4 часа до начала анализа.
6. **Аппаратура**
 - a) автоматическая система для промывания микроплашек;
 - б) регистрирующая система для микроплашек; или
 - в) полностью автоматический анализатор для микроплашек.

Перед использованием всей аппаратуры должна быть проверена правильность ее работы.

Полную информацию о рекомендуемых системах, протоколах программного обеспечения и процедурах проверки можно получить у местного представителя.
7. **Одноразовые ванночки для реагентов** (кат. № 5F24-01).
8. **Гипохлорит натрия** для деконтаминации. (См. **Правила безопасности**)
9. **Раствор гидроксида натрия (0,1M)**. (См. **Меры предосторожности во время анализа**)

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа внимательно прочитайте раздел **Меры предосторожности во время анализа**.

Визуально контролируйте внесение различных компонентов в ячейку по соответствующему окрашиванию.

Разбавитель образца имеет зеленую/коричневую окраску. При добавлении образца пациента или контроля цвет изменяется на синий/зеленый. Цвет разбавленных образцов может отличаться, но изменение окраски должно наблюдаться. Добавление образца или контроля можно подтвердить с помощью регистрирующей системы для микроплашек при 570 или 620 нм с длиной волны сравнения 690 нм.

Восстановленный конъюгат имеет красную окраску. Добавление конъюгата можно подтвердить с помощью регистрирующей системы для микроплашек при 490 нм с длиной волны сравнения 690 нм.

Раствор субстрата сначала имеет бледно-желтый цвет, в ячейках с реактивными образцами он становится сине-зеленым. После добавления стоп-раствора цвет в ячейках с реактивными образцами из сине-зеленого становится оранжевым, в то время как в ячейках с неактивными образцами – розовым. Добавление раствора субстрата можно подтвердить с помощью регистрирующей системы для микроплашек при 450 нм (без сравнения).

ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Этап 1	Восстановите и перемешайте конъюгат, приготовьте раствор субстрата и промывочную жидкость.	
Этап 2	Используйте только необходимое для анализа количество ячеек. Не касайтесь верхушек и дна ячеек.	
Этап 3	Внесите 25 мкл разбавителя образца в каждую ячейку.	25 мкл
Этап 4	Добавьте 100 мкл образца или 100 мкл контроля в ячейки. В каждой плашке используйте первый столбец ячеек для анализа контролей. Контроли вносите в обозначенные ячейки после добавления образцов. Внесите по 100 мкл отрицательного контроля в каждую из 3 ячеек A1-C1 и по 100 мкл положительных контролей p24, антител к ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-2 в ячейки D1-F1, соответственно. Используйте белый фон для визуального контроля за внесением образцов.	100 мкл
Этап 5	Закройте ячейки крышкой и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37±1°C.	60 мин
Этап 6	После завершения инкубации промойте плашку, как описано в разделе Процедура промывания.	
Этап 7	Сразу после промывания плашки в каждую ячейку добавьте 100 мкл конъюгата.	100 мкл
Этап 8	Закройте ячейки крышкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37±1°C.	30 мин
Этап 9	После завершения инкубации промойте плашку, как описано в разделе Процедура промывания.	
Этап 10	Сразу после промывания плашки в каждую ячейку добавьте 100 мкл раствора субстрата.	100 мкл
Этап 11	Закройте ячейки крышкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37±1°C. Не допускайте попадания прямых солнечных лучей. В ячейках с реактивными образцами появится сине-зеленое окрашивание.	30 мин
Этап 12	В каждую ячейку добавьте 50 мкл стоп-раствора (серная кислота, от 0,5M до 2M).	50 мкл
Этап 13	В течение 15 минут анализируйте оптическую плотность при 450 нм с длиной волны сравнения 620–690 нм, если возможно. Проведите холостую пробу по воздуху (без плашки).	A ₄₅₀

ПРОЦЕДУРЫ ПРОМЫВАНИЯ

Протоколы по рекомендуемым системам для промывания и процедур проверки этих систем и анализаторов можно получить у местного представителя. Рекомендуется следовать следующему протоколу:

а) Протокол автоматического промывания

Проведите 5 циклов промывания с помощью промывочной жидкости рабочей концентрации. По возможности убедитесь, что:

- Общий объем жидкости в каждой ячейке составляет 500 мкл, при использовании аппаратуры DiaSorin. При использовании другой аппаратуры проверьте, чтобы ячейка была полностью наполнена.
- Уровень наполнения установлен так, чтобы ячейка полностью наполнялась (со слегка положительным мениском), но не переполнялась.
- Для проведения одного полного цикла аспирации/промывания/замачивания требуется приблизительно 30 секунд.
- В ячейке не осталось жидкости (по возможности дважды повторяйте этап аспирации в последнем цикле).
- После завершения промывания переверните плашку и постучите по поверхности, покрытой абсорбирующей бумагой, чтобы удалить остатки промывочной жидкости.

ПРИМЕЧАНИЕ. Во время процедуры анализа не допускайте высыхания ячеек.

Во избежание засорения и появления ржавчины в конце каждого теста промывайте промывочное устройство дистиллированной или деионизированной водой.

ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ МИКРОПЛАШЕК Полную информацию об утвержденных протоколах, доступных в настоящее время, можно получить у местного представителя. Работу без утвержденного протокола рекомендуется проводить в соответствии со следующими правилами:

- Не устанавливайте время анализа меньше, чем указано в процедуре.
- Увеличивать установленную длительность инкубации при 37°C можно не более чем на 5 минут.
- Ячейки с разбавителем образца можно оставлять при температуре 18-30°C не более 60 минут перед внесением образца и не более 15 минут после добавления образца или контроля перед началом проведения 5 этапа.
- Обеспечьте соблюдение всех мер предосторожности во время анализа.

Протоколы, составленные согласно этим правилам, следует полностью валидировать, прежде чем использовать в соответствии с местными правилами процедуры анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчет и интерпретация результатов в каждой плашке производится отдельно.

Для расчета и интерпретации результатов можно использовать утвержденные компьютерные программы.

Отрицательный контроль

Рассчитайте среднюю оптическую плотность отрицательного контроля.

Пример

Ячейка 1	=	0,084	Ячейка 2	=	0,086	Ячейка 3	=	0,070
						Всего	=	0,240
Среднее значение отрицательного контроля							=	0,240/3
							=	0,080

Если в одной из ячеек с отрицательным контролем оптическая плотность превышает среднее значение (по трем ячейкам) более чем на 0,15 ед., пересчитайте среднее значение по двум оставшимся ячейкам, не учитывая значение в этой ячейке.

Пороговое значение

Рассчитайте пороговое значение, прибавив 0,150 к среднему значению отрицательного контроля (см. выше).

Среднее значение отрицательного контроля = 0,080

Пороговое значение = 0,080 + 0,150 = 0,230

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результат анализа считается достоверным, если результаты анализа контролей соответствуют следующим критериям:

Отрицательный контроль

Средняя оптическая плотность должна быть меньше 0,15.

Положительные контроли

Оптическая плотность каждого положительного контроля должна превышать среднее значение отрицательного контроля больше чем на 0,8.

Если результат не удовлетворяет критериям, анализ необходимо повторить.

Если результаты повторного анализа также не будут удовлетворять критериям контроля качества или ожидаемым характеристикам теста (что маловероятно), свяжитесь с местным торговым представителем.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нереактивные результаты

Образцы с оптической плотностью меньше порогового значения расцениваются как отрицательные в данном анализе.

Реактивные результаты

Образцы с оптической плотностью, равной или превышающей пороговое значение, расцениваются как первично реактивные в данном анализе (см. раздел **Ограничения процедуры**).

Если местными правилами процедуры анализа не предусмотрено иного, такие образцы **должны** быть протестированы еще раз в двух повторях (из той же пробы). Образцы, реактивные хотя бы в одном из повторных тестов, расцениваются как повторно реактивные в Murex HIV Ag/Ab Combination и предположительно содержащие ядерный антиген ВИЧ и/или антитела к ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Такие образцы **должны** исследоваться дополнительно, а результаты этого анализа рассматривать вместе с любой другой клинической и/или аналитической информацией. Нереактивные образцы в обеих ячейках, т.е. с оптической плотностью меньше порогового значения, расцениваются как нереактивные на ядерный антиген ВИЧ и/или антитела к ВИЧ.

Отсутствие образца в ячейке

Значения оптической плотности, значительно превышающие значения отрицательного контроля, могут быть получены в ячейках, в которых было пропущено внесение образца, а все реагенты были добавлены.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Характеристики тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination оценивали с помощью анализа произвольно выбранных образцов доноров крови, пациентов с диагнозом СПИД (по критериям CDC), пациентов со СПИД-ассоциированным комплексом, пациентов с обнаруженными антителами к ВИЧ-1 (включая группу O), пациентов с подтвержденной инфекцией ВИЧ-2, пациентов с риском ВИЧ-инфекции и других клинических категорий. Кроме того, тест-систему оценивали с помощью коммерческой панели сероконверсии.

Диагностическая чувствительность

С помощью тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination было проанализировано 497 образцов пациентов с подтвержденной инфекцией ВИЧ-1. Все образцы оказались реактивными в данном тесте. Образцы были получены от пациентов с ВИЧ-инфекцией на разных стадиях, они включали 24 образца пациентов с инфекцией ВИЧ-1 подтипа O и 139 образцов пациентов, инфицированных ВИЧ-1 других подтипов, за исключением подтипа B.

Кроме того, с помощью тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination было проанализировано 100 образцов пациентов с подтвержденной инфекцией ВИЧ-2. Все образцы оказались реактивными в данном тесте.

Диагностическая чувствительность тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination на материале этих образцов, установленная с помощью биномиального распределения, составила 100% (597/597) с нижним пределом 95%-ного доверительного интервала 99,38% (593/597).

С помощью тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination было проанализировано 26 панелей сероконверсии ВИЧ-1. В качестве сравнительного критерия использовалось наличие в Вестерн-блоттинге двух полос – ядра (p24) и оболочки (gp 120/160). В тест-системе Murex HIV Ag/Ab Combination во всех панелях антитела к ВИЧ обнаруживались раньше или в том же образце, что и в Вестерн-блоттинге.

Диагностическая специфичность

При анализе образцов европейских доноров крови специфичность анализа с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination составила $\geq 99,5\%$. С помощью тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination было проанализировано 9290 образцов доноров крови в трех европейских центрах переливания крови. Результаты суммированы в таблице 3. В данном исследовании 99,77% (9269/9290) образцов были нереактивными, 0,23% (21/9290) – повторно реактивными. Один из повторно реактивных образцов был слабо положительным в анализе с использованием тест-системы Murex HIV Antigen mAb (8E77). Наличие антигена ВИЧ-1 или антител к ВИЧ-1 или ВИЧ-2 не было подтверждено ни в одном из оставшихся 20 повторно положительных образцов.

Специфичность анализа с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination на материале предположительно отрицательных образцов европейских доноров крови, установленная с помощью биномиального распределения, составила 99,78% (9269/9289) с 95%-ным доверительным интервалом от 99,67% (9258/9289) до 99,87% (9277/9289).*

С помощью тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination протестировали 267 образцов пациентов с заболеваниями, не связанными с ВИЧ-инфекцией. Сюда включали образцы беременных, больных аутоиммунной патологией и другими острыми вирусными инфекциями. 5 образцов оказались реактивными в Murex HIV Ag/Ab Combination, 4 образца были реактивными в двух других коммерческих скрининговых с тест-системах. В Вестерн-блоттинге 4 образца имели промежуточный результат, а 1 – отрицательный.

Кроме того, нереактивными в анализе с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination оказалось 38 образцов с гемолизом, повышенным содержанием липидов и билирубина.

Таким образом, в этом исследовании общая диагностическая специфичность тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination на материале подтвержденных отрицательных образцов, установленная с помощью биномиального распределения, составила 99,78% (9569/9590), с 95%-ным доверительным интервалом от 99,67% (9558/9590) до 99,86% (9577/9590).

* Представлены репрезентативные данные эффективности. Результаты других лабораторий и других популяций могут отличаться.

Воспроизводимость анализа

Воспроизводимость анализа с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination оценивали с помощью анализа двух контролей и четырех панелей контроля качества (QA) в 10 повторях 4-кратно. Результаты этого исследования суммированы в **таблице 4**.

Таблица 3
Реактивность анализа с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination на материале предположительно отрицательных образцов европейских доноров крови

Центр	Кол-во предпол. отрицательных образцов	Кол-во повторно реактивных образцов
A	3095	6 ^a (0,19%)
B	2803	9 (0,32%)
C	3392	6 (0,18%)
ВСЕГО	9290	21 (0,23%)

^a Включая 1 образец, который был слабо положительным в Murex HIV Antigen mAb (8E77).

Таблица 4
Воспроизводимость анализа с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination

Образец	Кол-во анализов	Кол-во повторов	Среднее значение оптической плотности/ пороговое значение	%CV внутри запуска	%CV между запусками
Отрицательный контроль	4	10	0,266	8,7	11,3
Положит. контроль ВИЧ-1	4	10	8,287	4,3	4,7
QA01	4	10	3,672	4,6	7,3
QA02	4	10	4,696	5,6	12,9
QA03	4	10	3,006	3,9	4,2
QA04	4	10	1,663	6,8	9,2

Чувствительность на стандарте AFSSAPS HIV Ag

Чувствительность анализа с использованием тест-системы Murex HIV Ag/Ab Combination на стандарте AFSSAPS HIV Ag исследовали в трех лабораториях.

Таблица 5
Чувствительность на стандарте AFSSAPS HIV Ag

Центр	Антиген ВИЧ, пг/мл
1	31
2	28
3	25
Среднее значение	28

Данные таблицы 5, полученные в этом исследовании, могут не быть точно воспроизводимы в других исследованиях.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Соблюдайте этапы, описанные в разделах **Процедура анализа** и **Интерпретация результатов**.
2. Методика предназначена только для анализа отдельно взятых (не объединенных) образцов сыворотки крови или плазмы крови с ЭДТА или цитратом.
3. Отрицательный результат анализа на антиген/антитела не исключает наличия ВИЧ-инфекции.
4. Положительный результат в анализе Murex HIV Ag/Ab Combination должен быть подтвержден с помощью по крайней мере еще одного теста.
5. При использовании любых иммуноферментных анализов возможно получение однократно реактивных результатов.
Самые частые причины получения ошибочных результатов анализа:
 - а) внесение в ячейку неправильного количества образца, конъюгата или субстрата;
 - б) попадание конъюгата в субстрат;
 - в) попадание конъюгатов из других анализов;
 - г) полная или частичная закупорка промывочных зондов;
 - д) недостаточная аспирация, приводящая к тому, что в ячейке остается небольшое количество промывочной жидкости;
 - е) отсутствие проверки того, чтобы дно ячейки было чистым и сухим, а на поверхности жидкости в ячейке перед считыванием результата в плашке отсутствовали пузырьки воздуха;
 - ж) неправильно выбрана длина волны для анализа (450 нм) или длина волны сравнения (620-690 нм).
6. Использование образцов с выраженным гемолизом или значимой микробной контаминацией, сыворотки с неполным свертыванием крови, а также плазмы с фибрином может привести к получению неправильных результатов анализа.
7. Возможность анализа с помощью этой методики образцов трупной крови не оценивалась.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. **Clavel, F.** (1987). HIV-2: the West African Aids virus. *AIDS*, **1**, 135.
2. **Simon, F. et al.** (1998) *Nat. Med.*, **4**, 1032. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.
3. **Denis, F., Leonard, G. et al.** (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1000.
4. **Vanden Haesevelde, M., Decourt, J. et al.** (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.*, **68**, 1586.
5. **Gürtler, L.G., Hauser, P.H. et al.** (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.*, **68**, 1581.
6. **Loussert-Ajaka, I., Ly, T.D. et al.** (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV subtype O infected patients. *Lancet*, **343**, 1393.
7. **Gains, H., von Sydons, H. et al.** (1988). Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS*, **2**, 11.
8. **Centres for Disease Control.** (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.

Bronidox® и ProClin® не являются торговыми знаками компании DiaSorin.



DiaSorin S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123

E06DS41GB

September 2014