



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE
„CANTACUZINO”

Splaiul Independenței 103, București, 050096

LABORATORUL NATIONAL DE REFERINTA PENTRU ITS

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Sef laborator ITS	Manager calitate	Director LNR
Nume prenume	Dr. Dan Ionescu		
Semnatura*			
Data			

* Semnatura se aplică pe documentul original

INSTRUCTIUNE DE LUCRU

VIRONOSTIKA HIV UNI-FORM II Ag/Ab

Cod:

Editia :

Revizia :

Data aplicarii :

Avertisment Documentul de fata este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »
Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»
Copiile sunt numerotate si controlate.

Exemplar nr : _____

Destinatarul: _____

Exemplar : controlat necontrolat

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	INSTRUCTIUNE DE LUCRU VIRONOSTIKA HIV UNI-FORM II Ag/Ab cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

1 SCOP

Instructiunea descrie operatiunile necesare determinarii Ag/Ac HIV in ser/plasma prin metoda ELISA cu trusa Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab(BIOMERIEUX)

2 MOD DE LUCRU

2.1 Resurse necesare

2.1.1 Reactivi

Kit VIRONOSTIKA UNI FORM II Ag/Ac:

Placi	
Control negativ	CONTROL - (1CN)
Control pozitiv anti-HIV-1	CONTROL + Ab-1 (1C1)
Control pozitiv anti-HIV-2	CONTROL + Ab-2 (1C2)
Control pozitiv antigen HIV-1	CONTROL + Ag (1C3)
Diluent proba	SpecDil (1DS)
Tampon fosfat concentrat	WashBuf 25x (1WC)
Solutie TMB (tetrametilbenzidina in acid citric)	TMB (1TC)
Solutie peroxid de uree	UP (1UC)

Neincluse in kit:

Apa distilata sau apa deionizata

Acid sulfuric 1M

2.1.2 Consumabile

Conuri prelevare

Hartie de filtru

Manusi

2.1.3 Aparatura

Incubator

Agitator

Spalator

Frigider / Congelator

Cititor de placi

Pipepete mono si multi canal

Computer

Cilindrii gradati: 50ml, 100 ml, 1000 ml, 2000ml

Imprimanta

2.2 Executia testului

Toti reactivii vor sta la temperatura camerei (+19 +29°C) cel putin 30 min. inaintea lucrului.

Stripurile nefolosite, bine inchise, sunt valabile 8 saptamani daca sunt pastrate la +2 + 8°C.

Se verifica temperatura camerei si se inregistreaza in Fisa de lucru cod:

Se inregistreaza echipamentele de lucru, lotul si data expirarii trusei, tipul de proba

Se stabilesc pozitile in grila, notand numarul unic al probelor si martorii.

A1 – martor negativ

B1 – martor negativ

C1 - martor negativ

D1 – martor pozitiv de HIV1

E1 - martor pozitiv de HIV2

F1 – martor pozitiv pentru Ag

G1..... – probe pacienti si probe control laborator

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	INSTRUCTIUNE DE LUCRU VIRONOSTIKA HIV UNI-FORM II Ag/Ab cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

2.2.1. Prepararea tamponului fosfat (lichid de spalare)

Se verifica daca tamponul fosfat are sau nu cristale in interior.

Daca se remarca prezenta cristalelor, se va incalzi la + 37°C, pana cand cristalele se redizolva.

Se calculeaza volumul de tampon diluat necesar (dilutie 1:25)

- Se prepara cel putin 25 mL de solutie pentru fiecare strip (1 mL tampon fosfat concentrat + 24 mL apa distilata/deionizata)

Se recomanda 625 mL solutie (600 mL apa distilata/deionizata + 25 mL tampon fosfat concentrat) pentru o placa. Se inregistreaza volumul preparat, data prepararii si data expirarii in fisa de lucru (solutia este stabila 2 saptamani daca este pastrata la +2 + 8°C.)

2.2.2 Se inspecteaza ca stripurile alese pentru lucru sa contina sfera cu conjugat.

2.2.3. Se pipeteaza 100 µL diluent proba in toate godeurile. Sfera purpurie se dizolva si apare o solutie colorata in verde. Daca nu se utilizeaza toate godeurile, chiar in cele in care nu se pune proba, se pune diluent pentru a nu strica spalatorul.

2.2.4. Se pipeteaza 50 µL probe de cercetat (ser sau plasma) si cate 50 µL controale. Culoarea se schimba de la verde la bleu-roz. Controalele se pipeteaza dupa probe.

2.2.5. Se agita 15 secunde pe agitator.

2.2.6. Se incubeaza la +37°C timp de 60 ± 5 min.

In acest interval se prepara TMB substrat.

2.2.7. Preparare TMB substrat: se amesteca parti egale de TMB solutie, cu solutie de peroxid de uree.

Cantitatea se prepara in functie de numarul de stripuri utilizate:

- 2 stripuri: 1,5 mL TMB solutie + 1,5 mL peroxid de uree
- 4 stripuri: 2,5 mL TMB solutie + 2,5 mL peroxid de uree
- 6 stripuri: 3 mL TMB solutie + 3 mL peroxid de uree
- 8 stripuri: 4 mL TMB solutie + 4 mL peroxid de uree
- 10 stripuri: 5 mL TMB solutie + 5 mL peroxid de uree
- 12 stripuri: 6 mL TMB solutie + 6 mL peroxid de uree

Se amesteca bine. Se protejeaza de lumina. Solutia trebuie sa fie aproape incolora. Nu trebuie sa vina in contact cu metale sau cu ioni de metale. Pastrata la intuneric este stabila 8 ore la temperatura camerei .

Se inregistreaza pe recipient si in fisa de lucru ora prepararii si ora expirarii.

2.2.8. Se spala cu tamponul fosfat diluat 1/25 de 6 ori.

2.2.9. Nu trebuie sa ramana urme de lichid in godeuri.

2.2.10. Se pipeteaza 100 µL de TMB substrat in fiecare godeu. Nu se amesteca, nu se agita.

2.2.11. Se incubeaza la temperatura camerei, timp de 30 ± 2 min.

2.2.12. Stoparea reactiei

Se adauga 100 µL de acid sulfuric 1M in fiecare godeu.

Se bate usor marginea suportului pentru a se amesteca bine.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	INSTRUCTIUNE DE LUCRU VIRONOSTIKA HIV UNI-FORM II Ag/Ab cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

3. Citire

3.1 Placa se citește într-un interval de 15min. la 450 nm și 620 nm.

Printul se atașează la fișa de lucru.

Valorile densității optice și cut-off se transcriu în Registrul rezultate serologie cod:.

4. Interpretare test

4.1 Validare

Se înregistrează absorbantele Controalelor negative (CN).

Fiecare CN trebuie să fie mai mic decât 0.250 (< 0.250).

Controlul mai mare de 0.250 se elimină.

Dacă se elimină două Controale, testul nu mai este validat.

Pentru a determina media Controalelor negative (CN mediu), se adună valorile marilor negativi buni și se împarte la 3 sau la 2, în funcție de câte Controale negative s-au validat.

Controalele negative trebuie să aibă o valoare mai mică sau egală cu $1.4 \times \text{CN mediu}$ ($\leq 1.4 \times \text{CN mediu}$).

Se elimină Controlul negativ, care are o valoare mai mare decât $1.4 \times \text{CN mediu}$ ($> 1.4 \times \text{CN mediu}$).

Se recalculează CN mediu cu Controalele negative rămase valide.

Deasemenea, Controalele negative trebuie să aibă o valoare mai mare decât valoarea $0.6 \times \text{CN mediu}$ ($> 0.6 \text{ CN mediu}$).

Se elimină Controlul negativ care are o valoare mai mică decât 0.6 CN mediu ($< 0.6 \times \text{CN mediu}$).

Se recalculează CN mediu cu Controalele rămase valide.

Testul este valid dacă:

Două Controale negative se validează

Valoarea Controlului Pozitiv pentru Ac-HIV1 (PC1) - CN mediu ≥ 0.600

Valoarea Controlului Pozitiv pentru Ac-HIV2 (PC2) – CN mediu ≥ 0.600

Valoarea Controlului pentru Ag (PC3) – CN mediu ≥ 0.400 .

4.2 Calcularea valorii **cut-off** : CN mediu + 0.100

4.3 Proba pozitivă are absorbanta \geq cut-off (sau DO/CO ≥ 1)

Proba negativă are absorbanta $<$ cut-off (sau DO/CO < 1)

5 CRITERII DE ACCEPTARE / RESPINGERE

Rezultatele testului sunt acceptate numai dacă s-a îndeplinit condiția de interpretare/validare a testării (pct. 4), în caz contrar testarea se repetă.

6 FORMULARE, INREGISTRARI

6.1 Fișa de lucru ELISA Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab cod :

6.2 Registrul rezultate serologie cod :

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	INSTRUCTIUNE DE LUCRU VIRONOSTIKA HIV UNI-FORM II Ag/Ab cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

Anexe :

Model Fisa de lucru ELISA Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab cod :

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO C.N.E.M.M.	FISA DE LUCRU ELISA Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab cod : F-RS-EM05-20	Ediția: 1 Revizia: # Data aplicării: # 18# 2007												
FISA NR.: _____ DATA TESTARII _____														
Termostatu ID:	Temperatura camerei	Valori specificate: 5 - 30 °C												
Valoarea constatata:														
Hpeta ID:	Incubator ID:	Spalator ID:												
Cititor ID:														
Lot trusa:	Data expirarii:	Tip proba:												
Prepararea tamponului fosfat	Volum:	Data prepararii:												
Data expirarii:														
Prepararea TMB substrat	Ora prepararii:	Ora expirarii:												
GRILA														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A														
B														
C														
D														
E														
F														
G														
H														
Validare test:														
$CN_1 =$	<input type="checkbox"/>	$CN_2 =$	<input type="checkbox"/>	$CN_3 =$	<input type="checkbox"/>	$CP_1 =$	<input type="checkbox"/>	$CP_2 =$	<input type="checkbox"/>	$CP_3 =$				
$CN_1 < 0.250$ 3 sau minim 2 CN valide							$CP_1 (pt Ag HIV1) - CN_{medie} =$						(≥ 0.600)	<input type="checkbox"/>
$CN_{medie} = \sum_{i=1}^n CN_i / n =$							$CP_2 (pt Ag HIV2) - CN_{medie} =$						(≥ 0.600)	<input type="checkbox"/>
$(0.6 \times CN_{medie}) < CN_1 \leq (1.4 \times CN_{medie})$							$CP_3 (pt Ag) - CN_{medie} =$						(≥ 0.400)	<input type="checkbox"/>
$CO = CN_{medie} + 0.1 =$							Proba reactiva $\geq CO$					Proba nereactiva $< CO$		
Se ataseaza rezultatele tiparite de imprimanta cititorului linei ELISA.														
Observatii:														
Operator										Se repetă testul <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NU				
										Responsabil de analiza				
Pagina 1 din 1														