

УТВЕРЖДЕНА

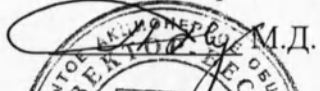
Приказом Росздравнадзора

от 29.06. 2009 г. № 5213 - пр/с9

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов
2009 г.

Копия



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

антител к вирусам иммунодефицита 1 и 2 типов

«КомбиБест анти-ВИЧ-1+2»

(комплект № 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов КомбиБест анти-ВИЧ-1+2 (комплект № 1) предназначен для иммуноферментного выявления антител к вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типов в сыворотке (плазме) крови человека.

1.2. Комплект № 1 рассчитан на проведение 192 (2×96) анализов, включая контрольные (по 5 лунок на каждой планшете), без использования ИФА-анализаторов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

При инкубации в лунках исследуемых образцов сывороток происходит одновременное специфическое связывание антител с рекомбинантными антигенами вирусов иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), иммобилизованными на поверхности лунок планшета и рекомбинантными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2, входящими в состав конъюгата. Несвязавшийся материал отмывают и вносят в лунки раствор ТМБ. В результате ферментативной реакции образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации в лунках антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистра-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником отделения Костюковой И.А.

ция результатов только с фильтром 450 нм.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора

Комплект № 1 набора содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет цельный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2 – 2 шт.;
 - положительный контрольный образец (K^+), инаktivированный – на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащей антитела к ВИЧ-1, жидкий – прозрачная красного цвета жидкость – 1 флакон (0,5 мл) или лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета – 1 флакон;
 - отрицательный контрольный образец (K^-), инаktivированный – на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащей антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, жидкость – прозрачная жёлтого цвета жидкость – 1 флакон (0,5 мл) или лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета – 1 флакон;
 - конъюгат – рекомбинантные белки ВИЧ-1, ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена – лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 или 2 флакона;
 - раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (3,0 мл);
 - раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная светло-серого цвета жидкость – 2 флакона (по 13,0 мл);
 - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании – 2 флакона (по 28,0 мл);
 - раствор тетраметилбензидина (ТМБ) – прозрачная, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость – 2 флакона (по 13,0 мл);
- или
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (1,5 мл);
- и субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 2 флакона (по 13,0 мл);

– стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (21,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность комплекта № 1 набора, определённая по стандартной панели сывороток, содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) в различных концентрациях «Стандарт АТ(+)ВИЧ-1» (РУ №ФСР 2007/00953), составляет 100 %.

Чувствительность комплекта № 1 набора, определённая по стандартной панели сывороток, содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека второго типа (ВИЧ-2) в различных концентрациях «Стандарт АТ(+)ВИЧ-2» (РУ №ФСР 2007/00953), составляет 100 %.

Специфичность комплекта № 1 набора, определённая по стандартной панели сывороток, не содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1,2) и антиген р24 ВИЧ-1 «Стандарт АТ(-)ВИЧ» (РУ №ФСР 2007/00953), составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру 37 °С;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до

1000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшета;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток, а также хранившихся при минус 20 °С не более 2 мес.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные образцы или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание!* Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.
- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.
- Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 мин до их использования.
- Сразу после постановки реакции неиспользованный планшет и плотно закрытые флаконы с исходными компонентами необходимо поместить в холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С.
- Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.
- При промывке лунки (планшета) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

– При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть заметного роста микроорганизмов. Раз в неделю ёмкость для промывочного раствора и шланги следует промывать 70% спиртом.

– Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями.

– При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, концентрат ТМБ, раствор ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Подготовка планшета

Вскрыть пакет и извлечь необходимое количество для анализа планшетов. Оставшийся неиспользованным планшет поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

7.2.2. Приготовление промывочного раствора

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При наличии осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Содержимое 1 флакона с ФСБ-Т×25 (28,0 мл) развести дистиллированной водой до 700

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С до 72 ч.

7.2.3. Приготовление контрольных образцов

Контрольные образцы (K^+ и K^-) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Если в состав набора входят лиофилизированные контрольные образцы, то необходимо растворить K^+ и K^- , добавив в каждый флакон по 300 мкл РПР.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С до 1 мес.

7.2.4. Приготовление растворов конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – при температуре от 2 до 8 °С до 2 недель.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК). Отобрать из флакона _____ мкл* концентрированного раствора конъюгата, внести во флакон с раствором для разведения конъюгата (РК) и тщательно взболтать.

Примечание: * – количество (в мкл) указано в паспорте и инструкции на данную серию наборов.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.2.5. Приготовление раствора ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ готов к использованию. Необходимо исключить попадание прямого света на раствор ТМБ.

Если в состав набора входит ТМБ концентрат и СБР, то раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием. Для этого во флакон с СБР добавить 0,65 мл концентрата тетраметилбензидина и тщательно перемешать. Приготовленный раствор стабилен до 3 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

Внимание! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином.

7.3. Проведение анализа

Концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до его использования и выдержан при температуре от 18 до 25 °С.

Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.3.1. В любые три лунки внести по 30 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в две лунки - по 30 мкл положительного контрольного образца (K^+), во все остальные лунки внести по 30 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы).

Внимание! Сыворотки и контрольные образцы вносить в лунки аккуратно, избегая разбрызгивания.

7.3.2. Внести во все лунки по 120 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.4).

Внимание! Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки поверхности лунки и сыворотки, находящейся в ней. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.

7.3.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть планшет 7 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

7.3.4. Приготовить раствор ТМБ (п. 7.2.5) или использовать готовый раствор ТМБ.

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору. Остатки раствора ТМБ из ванночки не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре 18 до 25 °С.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

8.2. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху.

8.3. Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

8.4. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с K^- не более 0,2,
- значение ОП в лунках с K^+ не менее 0,8.

9.2. Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,15.$$

9.3. Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если соответствующее ей значение $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$.

Исследуемую сыворотку расценивать как отрицательную, если соответствующее ей значение $ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

Где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1 Транспортирование набора – при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2 Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя – при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3 Срок годности – 18 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

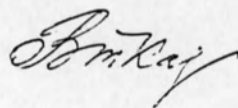
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E:mail: ybobtk@vector-best.ru

в Федеральное государственное учреждение науки «Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора по адресу:

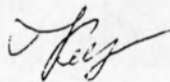
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (499) 241-39-22, тел./факс (499) 241-92-38.

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Нач. отделения ИФА СПИД
ЗАО «Вектор-Бест»



И.А. Костюкова

