

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «__» _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1
«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для одновременного выявления антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке (плазме) крови. Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови, органов, тканей человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли (по 4 лунки в каждой постановке), возможны до 12 независимых постановок анализа в ручном режиме или 2 постановки по 96 анализов с использованием автоматических ИФА-анализаторов открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод выявления основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ-1. При наличии в исследуемых образцах антител к ВИЧ-1 или ВИЧ-2 они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета (первая инкубация), к образовавшемуся комплексу во время второй инкубации присоединяется конъюгат рекомбинантных белков ВИЧ с пероксидазой хрена. При наличии в исследуемом образце антигена р24 ВИЧ-1, он в ходе первой инкубации связывается с моноклональными антителами к р24, иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и одновременно с биотинилированными поликлональными антителами к р24, присутствующими в растворе. В ходе второй инкубации к образовавшемуся комплексу присоединяется конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина про-

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

исходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы антиген-антитело. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1 в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антителами к антигену р24 ВИЧ-1, готовый для использования – 2 шт.;
- положительный контрольный образец № 1, содержащий антитела к ВИЧ-1, инактивированный ($K1^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- положительный контрольный образец № 2, содержащий рекомбинантный р24 ВИЧ-1, инактивированный ($K2^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), готовый для использования – 1 фл., 2,0 мл;
- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к р24 ВИЧ-1) – 1 фл.;
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза и рекомбинантные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 4,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РК № 1) – 2 фл. по 9,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РК № 2) – 2 фл. по 13 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 4 фл. по 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 2 фл. по 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 21 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипетки – 32 шт.;
- пленками для заклеивания планшета – 4 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-380: чувствительность по антителам к ВИЧ-1 – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-2 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-428: чувствительность по антителам к ВИЧ-2 – 100%.

3.3. Минимальная концентрация антигена p24 ВИЧ-1, достоверно определяемая набором - чувствительность по антигену p24 ВИЧ-1, должна быть не выше 10 пг/мл.

3.4. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-429: специфичность по антителам к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигену p24 ВИЧ-1 – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования МУ-287-113-00 и СП 1.3.2322-08.

4.4. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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 $(37 \pm 1) ^\circ C$;

– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1) ^\circ C$;

– холодильник бытовой;

– 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, позволя-

ющая отбирать объёмы жидкостей до 350 мкл;

- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- раствор дезинфицирующий.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°C не более 5 суток, либо при минус (20±3)°C, если необходимо более длительное хранение.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°C.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы хранить при (2-8) °C, использовать в течение 1 мес.

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

При промывке лунки планшета заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не долж-

но быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета 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, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сы-вороток.

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

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

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

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка.

Содержимое 1 флакона (28 мл) с ФСБ-Т×25 развести дистиллированной водой до 700 мл. Тщательно перемешать.

При дробном использовании планшета в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов отобрать необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и развести его дистиллированной водой до указанного в таблице объема.

Хранение: при (2-8)°С до 5 суток.

7.2.2. Контрольные образцы.

Контрольные образцы (K1+, K2+, K-) готовы к использованию. Перед употреблением встряхнуть.

Хранение после вскрытия: при (2-8)°С до 3 мес.

7.2.3. Растворы конъюгатов.

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

Приготовить концентрированные растворы конъюгатов путем растворения содержимого каждого флакона с конъюгатами № 1 и № 2 в 1 мл РПР.

Хранение: концентрированные растворы конъюгатов - при (2-8)°С до 1 мес. В случае более длительного хранения – при минус (18-40)°С. Допускается 5-кратное замораживание.

Внимание! Растворы конъюгатов № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить непосредственно перед использованием!

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата № 1, внести во флакон с РК № 1 и тщательно взболтать.

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата № 2, внести во флакон с РК № 2 и тщательно взболтать.

При дробном использовании планшета конъюгаты № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить в пластиковых ванночках, входящих в состав набора, в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

Во флакон с СБР добавить **650** мкл ТМБ и тщательно взболтать.

При дробном использовании планшета раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

Хранение: до 3 ч в защищённом от света месте при (18-25) °С.

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), концентрированные растворы конъюгатов (п. 7.2.3.)

Внимание! Промывочный раствор и концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °С.

7.3.2. Приготовить раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении (п. 7.2.3.).

7.3.3. В 1 лунку планшета внести 70 мкл К1+, в 1 лунку – 70 мкл К2+, в 2 лунки – по 70 мкл К-, в остальные лунки – по 70 мкл цельных тестируемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 70 мкл раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и од-

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

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 60 мин при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 45 мин при 600 об/мин и температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ (процедура 2).

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 7 раз промывочным раствором.

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 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. При автоматической отмывке рекомендуется использовать опцию перекрестной аспирации.

Не допускать высыхания лунок планшетов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 20 мин при 600 об/мин и температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ (процедура 2).

Внимание! При проведении анализа на автоматическом ИФА-анализаторе использовать только процедуру 2.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 7 раз промывочным раствором, как описано выше.

7.3.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении.

Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^{\circ}\text{C}$.

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

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

Таблица расхода реагентов

Внимание! Возможно проведение не более 12 независимых постановок анализа, независимо от числа стрипов, используемых в каждой постановке.

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор.												
ФСБ-Тх25, мл	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дистиллированная вода, мл	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1200
Раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 1, мкл	k_1^*	$2 \times k_1$	$3 \times k_1$	$4 \times k_1$	$5 \times k_1$	$6 \times k_1$	$7 \times k_1$	$8 \times k_1$	$9 \times k_1$	$10 \times k_1$	$11 \times k_1$	$12 \times k_1$
РК № 1, мл	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5	4,2	4,9	5,6	6,3	7,0	7,7	8,4
Раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 2, мкл	k_2^*	$2 \times k_2$	$3 \times k_2$	$4 \times k_2$	$5 \times k_2$	$6 \times k_2$	$7 \times k_2$	$8 \times k_2$	$9 \times k_2$	$10 \times k_2$	$11 \times k_2$	$12 \times k_2$
РК № 2, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении.												
ТМБ, концентрат, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$k_1 = \bullet \bullet \bullet$ мкл

$k_2 = \bullet \bullet \bullet$ мкл

Значения коэффициентов k_1 и k_2 указаны в инструкции и в паспорте на данную серию наборов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^-$) не более 0,25;
- значение ОП в лунках с положительными контрольными образцами $K1^+$ и $K2^+$ не менее 0,8.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp} K^- + 0,1$$

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

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

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» обращаться:

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, 363-13-46.

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. отделения ИФА СПИД
ЗАО «Вектор-Бест»

 И.А. Костюкова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Ректор ГБОУ ВПО НГМУ
Минздравсоцразвития России
М.П.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
9 листов



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «__» _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1

«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для одновременного выявления антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке (плазме) крови. Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови, органов, тканей человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли (по 4 лунки в каждой постановке), возможны 12 независимых постановок по 8 анализов в каждой в ручном режиме или 1 постановка 96 анализов с использованием автоматических ИФА-анализаторов открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод выявления основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ-1. При наличии в исследуемых образцах антител к ВИЧ-1 или ВИЧ-2 они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета (первая инкубация), к образовавшемуся комплексу во время второй инкубации присоединяется конъюгат рекомбинантных белков ВИЧ с пероксидазой хрена. При наличии в исследуемом образце антигена р24 ВИЧ-1, он в ходе первой инкубации связывается с моноклональными антителами к р24, иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и одновременно с биотинилированными поликлональными антителами к р24, присутствующими в растворе. В ходе второй инкубации к образовавшемуся комплексу присоединяется конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина про-

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

исходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы антиген-антитело. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1 в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антителами к антигену р24 ВИЧ-1, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец № 1, содержащий антитела к ВИЧ-1, инактивированный ($K1^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- положительный контрольный образец № 2, содержащий рекомбинантный р24 ВИЧ-1, инактивированный ($K2^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), готовый для использования – 1 фл., 2,0 мл;
- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к р24 ВИЧ-1) – 1 фл.;
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза и рекомбинантные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) - 1 фл., 4,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РК № 1) – 1 фл., 9,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РК № 2) – 1 фл., 13 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипетки – 32 шт.;
- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-380: чувствительность по антителам к ВИЧ-1 – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-2 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-428: чувствительность по антителам к ВИЧ-2 – 100%.

3.3. Минимальная концентрация антигена p24 ВИЧ-1, достоверно определяемая набором, (чувствительность по антигену p24 ВИЧ-1) должна быть не выше 10 пг/мл.

3.4. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-429: специфичность по антителам к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигену p24 ВИЧ-1 – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования МУ-287-113-00 и СП 1.3.2322-08.

4.4. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьёзному искажению результатов ИФА.

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 $(37 \pm 1)^\circ C$;
- термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ C$;
- холодильник бытовой;
- 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 планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- раствор дезинфицирующий.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы хранить при (2-8) °С, использовать в течение 1 мес.

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

При промывке лунки планшета заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета 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, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сы-вороток.

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

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

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

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема или содержимое флакона (28 мл) – до 700 мл.

Хранение: при (2-8)°С до 5 суток

7.2.2. Контрольные образцы.

Контрольные образцы (K1+, K2+, K-) готовы к использованию. Перед употреблением встряхнуть.

Хранение после вскрытия: при (2-8)°С до 3 мес.

7.2.3. Растворы конъюгатов.

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

Приготовить концентрированные растворы конъюгатов путем растворения содержимо-

го каждого флакона с конъюгатами № 1 и № 2 в 1 мл РПР.

Хранение: концентрированные растворы конъюгатов - при (2-8)°С до 1 мес. В случае более длительного хранения – при минус (18-40)°С. Допускается 5-кратное замораживание.

Внимание! Растворы конъюгатов № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить в пластиковых ванночках, входящих в состав набора, непосредственно перед использованием!

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата № 1 (см таблицу), добавить соответствующее количество РК № 1, тщательно перемешать пипетированием.

В другую пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата № 2 (см таблицу), добавить соответствующее количество РК № 2, тщательно перемешать пипетированием.

7.2.4. Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ (см таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: до 3 ч в защищённом от света месте при (18-25) °С.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор.												
ФСБ-Тх25, мл	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дистиллированная вода, мл	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1200
Раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 1, мкл	k_1*	$2 \times k_1$	$3 \times k_1$	$4 \times k_1$	$5 \times k_1$	$6 \times k_1$	$7 \times k_1$	$8 \times k_1$	$9 \times k_1$	$10 \times k_1$	$11 \times k_1$	$12 \times k_1$
РК № 1, мл	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5	4,2	4,9	5,6	6,3	7,0	7,7	8,4
Раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 2, мкл	k_2*	$2 \times k_2$	$3 \times k_2$	$4 \times k_2$	$5 \times k_2$	$6 \times k_2$	$7 \times k_2$	$8 \times k_2$	$9 \times k_2$	$10 \times k_2$	$11 \times k_2$	$12 \times k_2$
РК № 2, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении.												
ТМБ, концентрат, мкл	50	100	150	200	250	300	050	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$$k_1 = \bullet \bullet \bullet \text{ мкл} \quad k_2 = \bullet \bullet \bullet \text{ мкл}$$

Значения коэффициентов k_1 и k_2 указаны в инструкции и в паспорте на данную серию наборов.

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°C до 1 месяца.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), концентрированные растворы конъюгатов (п. 7.2.3.).

Внимание! Промывочный раствор и концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °C.

7.3.2. Приготовить раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении (п. 7.2.3.).

7.3.3. В 1 лунку планшета внести 70 мкл K1+, в 1 лунку – 70 мкл K2+, в 2 лунки – по 70 мкл K⁻, в остальные лунки – по 70 мкл цельных тестируемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 70 мкл раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора. При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки поверхности лунки и сыворотки, находящейся в ней. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.

Лунки планшета заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 60 мин при температуре (37±1)°C (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 45 мин при 600 об/мин и температуре (37±1)°C (процедура 2).

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипа 7 раз промывочным раствором.

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

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Не допускать высыхания лунок планшетов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении.

Лунки планшета заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 20 мин при 600 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 2).

Внимание! При проведении анализа на автоматическом ИФА-анализаторе использовать только процедуру 2.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 7 раз промывочным раствором, как описано выше.

7.3.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении.

Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реagenta и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($\text{ОП}_{\text{ср}} \text{K}^-$) не более 0,25;

- значение ОП в лунках с положительными контрольными образцами K1^+ и K2^+ не менее 0,8.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} \text{K}^- + 0,1$$

Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если соответствующее ей значение $\text{ОП} \geq \text{ОП}_{\text{крит}}$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ.

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

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

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

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, 363-13-46.

Нач. отделения ИФА СПИД
ЗАО «Вектор-Бест»

Maaf

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

Am Kap

Ректор ГБОУ ВПО НГМУ
Минздравсоцразвития России
М.П.



М.П.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
9 листов

Б.А.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «__» _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1

«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»

(комплект 3/авто)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для одновременного выявления антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке (плазме) крови. Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови, органов, тканей человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли (по 4 лунки в каждой постановке) на автоматическом ИФА анализаторе, допускается «ручная» постановка иммуноферментного анализа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод выявления основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ-1. При наличии в исследуемых образцах антител к ВИЧ-1 или ВИЧ-2 они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета (первая инкубация), к образовавшемуся комплексу во время второй инкубации присоединяется конъюгат рекомбинантных белков ВИЧ с пероксидазой хрена. При наличии в исследуемом образце антигена р24 ВИЧ-1, он в ходе первой инкубации связывается с моноклональными антителами к р24, иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и одновременно с биотинилированными поликлональными антителами к р24, присутствующими в растворе. В ходе второй инкубации к образовавшемуся комплексу присоединяется конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы антиген-антитело. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител к ВИЧ-1,2

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

и антигена р24 ВИЧ-1 в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антителами к антигену р24 ВИЧ-1, готовый для использования – 2 шт;
- положительный контрольный образец № 1, содержащий антитела к ВИЧ-1, инактивированный ($K1^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- положительный контрольный образец № 2, содержащий рекомбинантный р24 ВИЧ-1, инактивированный ($K2^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), готовый для использования – 1 фл., 2,0 мл;
- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к р24 ВИЧ-1) – 2 фл.;
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза и рекомбинантные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена) – 2 фл. или 4 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 8 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РК № 1) – 2 фл. по 13 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РК № 2) – 2 фл. по 17 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 3 фл. по 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 2 фл. по 20 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 2 фл. по 1,5 мл;
- стоп-реагент – 2 фл. по 21 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- самоклеющимися этикетками со штрих-кодами для реагентов – 1 компл.

По желанию пользователя набор может дополнительно комплектоваться:

- ванночками для реагента – 4 шт;
- наконечниками для пипетки – 32 шт;
- пленками для заклеивания планшета – 4 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-380: чувствительность по антителам к ВИЧ-1 – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-2 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-428: чувствительность по антителам к ВИЧ-2 – 100%.

3.3. Минимальная концентрация антигена p24 ВИЧ-1, достоверно определяемая набором (чувствительность по антигену p24 ВИЧ-1) должна быть не выше 10 пг/мл.

3.4. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-429: специфичность по антителам к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигену p24 ВИЧ-1 – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования МУ-287-113-00 и СП 1.3.2322-08.

4.4. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьёзному искажению результатов ИФА.

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;

– автоматический ИФА анализатор;

– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °C;

– холодильник бытовой;

– 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 планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- раствор дезинфицирующий.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА.

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

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы сразу после постановки реакции поместить в холодильник (2-8)°С, использовать в течение 1 мес.

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

При промывке лунки планшета заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора), не допуская переливания промывочного раствора через края лунок. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

Не допускать высыхания лунок планшета 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, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

Посуду (флаконы, ванночки) для реактивов, используемые повторно, тщательно промывать дистиллированной водой, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

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

Посуду (ванночки), используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть дистиллированной водой.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка.

Содержимое 1 флакона с ФСБ-Т×25 развести дистиллированной водой до 700 мл.

Хранение: при (2-8)°С до 5 суток.

7.2.2. Контрольные образцы.

Контрольные образцы (К1+, К2+, К-) готовы к использованию. Перед употреблением встряхнуть.

Хранение после вскрытия: при (2-8)°С до 3 мес.

7.2.3. Растворы конъюгатов.

Внимание! Для работы с конъюгатами использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированные растворы конъюгатов путем растворения содержимого каждого флакона с конъюгатами № 1 и № 2 в 1 мл РПР.

Хранение: концентрированные растворы конъюгатов - при (2-8)°С до 1 мес.

Внимание! Растворы конъюгатов № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить непосредственно перед проведением ИФА!

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата № 1, внести во флакон с РК № 1 и тщательно взболтать.

При дробном использовании планшета в чистый флакон отобрать запрашиваемый ИФА-анализатором (исходя из количества исследуемых образцов) объем РК № 1, добавить ● ● ●/13 × объем РК № 1 (в мл) мкл концентрированного раствора конъюгата № 1.

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата № 2, внести во флакон с РК № 2 и тщательно взболтать.

При дробном использовании планшета в чистый флакон отобрать запрашиваемый ИФА-анализатором (исходя из количества исследуемых образцов) объем РК № 2, добавить ● ● ●/17 × объем РК № 2 (в мл) мкл концентрированного раствора конъюгата № 2.

Растворы конъюгатов в рабочем разведении должны быть использованы в течение 10 часов после приготовления.

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить непосредственно перед проведением ИФА! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

Во флакон с СБР добавить 1,0 мл ТМБ и тщательно перемешать.

При дробном использовании планшета в чистый флакон отобрать запрашиваемый ИФА-анализатором (исходя из количества исследуемых образцов) объем СБР, добавить 50 × объем СБР (в мл) мкл ТМБ.

Раствор ТМБ в рабочем разведении должен быть использован в течение 10 часов после приготовления.

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), растворы конъюгатов и ТМБ в рабочем разведении (пп. 7.2.3., 7.2.4.)

7.3.2. Промывочный раствор залить в соответствующий контейнер автоматического ИФА-анализатора. Емкости с контрольными образцами, растворами конъюгатов и ТМБ в рабочем разведении, стоп-реагентом разместить на борту ИФА-анализатора, при необходимости наклеив предварительно на них соответствующие этикетки со штрих-кодами.

7.3.3. Ввести в программу ИФА-анализатора следующий протокол выполнения анализа:

7.3.3.1. В 1 лунку планшета внести 70 мкл K1+, в 1 лунку – 70 мкл K2+, в 2 лунки – по 70 мкл K-, в остальные лунки – по 70 мкл цельных тестируемых сывороток.

7.3.3.2. Затем во все лунки внести по 70 мкл раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении.

7.3.3.3. Планшет инкубировать при встряхивании на шейкере в течение 45 мин при 600 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки планшета 7 раз промывочным раствором.

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 сек.

7.3.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении.

7.3.3.6. Планшет инкубировать при встряхивании на шейкере в течение 20 мин при 600 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.3.7. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 7 раз промывочным раствором, как описано выше.

7.3.3.8. Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

7.3.3.9. Планшет инкубировать в течение 30 мин при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

7.3.3.10. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Внимание! При «ручной» постановке ИФА:

- для внесения растворов конъюгата №1, конъюгата №2, раствора ТМБ следует использовать пластиковые ванночки и одноразовые наконечники. При внесении растворов нельзя касаться наконечником пипетки поверхности лунки или сыворотки, находящейся в ней;

- на время инкубаций планшета в термошейкере лунки необходимо заклеивать липкой плёнкой;

- 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, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, рефренс-фильтр в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($\text{ОП}_{\text{ср K}^-}$) не более 0,25;

- значение ОП в лунках с положительными контрольными образцами K1^+ и K2^+ не ме-

нее 0,8.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,1$$

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

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

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» обращаться:

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, 363-13-46.

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. отделения ИФА СПИД

ЗАО «Вектор-Бест»

И.А. Костюкова

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Ректор ГБОУ ВПО НГМУ

Минздравсоцразвития России

М.П.



И.О. Маринкин

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
листов

[Handwritten signature]



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «__» _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1

«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для одновременного выявления антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке (плазме) крови. Рекомендуются для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови, органов, тканей человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли (по 4 лунки в каждой постановке), возможны до 12 независимых постановок анализа в ручном режиме или 2 постановки по 96 анализов с использованием автоматических ИФА-анализаторов открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод выявления основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ-1. При наличии в исследуемых образцах антител к ВИЧ-1 или ВИЧ-2 они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета (первая инкубация), к образовавшемуся комплексу во время второй инкубации присоединяется конъюгат рекомбинантных белков ВИЧ с пероксидазой хрена. При наличии в исследуемом образце антигена р24 ВИЧ-1, он в ходе первой инкубации связывается с моноклональными антителами к р24, иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и одновременно с биотинилированными поликлональными антителами к р24, присутствующими в растворе. В ходе второй инкубации к образовавшемуся комплексу присоединяется конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина про-

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

исходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы антиген-антитело. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1 в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антителами к антигену р24 ВИЧ-1, готовый для использования – 2 шт.;
- положительный контрольный образец № 1, содержащий антитела к ВИЧ-1, инактивированный ($K1^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- положительный контрольный образец № 2, содержащий рекомбинантный р24 ВИЧ-1, инактивированный ($K2^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), готовый для использования – 1 фл., 2,0 мл;
- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к р24 ВИЧ-1) – 1 фл.;
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза и рекомбинантные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 4,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РК № 1) – 2 фл. по 9,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РК № 2) – 2 фл. по 13 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 4 фл. по 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 2 фл. по 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 21 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипетки – 32 шт.;
- пленками для заклеивания планшета – 4 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-380: чувствительность по антителам к ВИЧ-1 – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-2 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-428: чувствительность по антителам к ВИЧ-2 – 100%.

3.3. Минимальная концентрация антигена р24 ВИЧ-1, достоверно определяемая набором - чувствительность по антигену р24 ВИЧ-1, должна быть не выше 10 пг/мл.

3.4. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-429: специфичность по антителам к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигену р24 ВИЧ-1 – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования МУ-287-113-00 и СП 1.3.2322-08.

4.4. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьёзному искажению результатов ИФА.

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 $(37 \pm 1) ^\circ C$;

– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1) ^\circ C$;

– холодильник бытовой;

– 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, позво-

ляющая отбирать объёмы жидкостей до 350 мкл;

- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- раствор дезинфицирующий.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°C не более 5 суток, либо при минус (20±3)°C, если необходимо более длительное хранение.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°C.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы хранить при (2-8) °C, использовать в течение 1 мес.

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

При промывке лунки планшета заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не долж-

но быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета 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, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сы-вороток.

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

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

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

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка.

Содержимое 1 флакона (28 мл) с ФСБ-Т×25 развести дистиллированной водой до 700 мл. Тщательно перемешать.

При дробном использовании планшета в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов отобрать необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и развести его дистиллированной водой до указанного в таблице объёма.

Хранение: при (2-8)°С до 5 суток.

7.2.2. Контрольные образцы.

Контрольные образцы (K1+, K2+, K-) готовы к использованию. Перед употреблением встряхнуть.

Хранение после вскрытия: при (2-8)°С до 3 мес.

7.2.3. Растворы конъюгатов.

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

Приготовить концентрированные растворы конъюгатов путем растворения содержимого каждого флакона с конъюгатами № 1 и № 2 в 1 мл РПР.

Хранение: концентрированные растворы конъюгатов - при (2-8)°С до 1 мес. В случае более длительного хранения – при минус (18-40)°С. Допускается 5-кратное замораживание.

Внимание! Растворы конъюгатов № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить непосредственно перед использованием!

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата № 1, внести во флакон с РК № 1 и тщательно взболтать.

Отобрать из флакона ● ● ● мкл концентрированного раствора конъюгата № 2, внести во флакон с РК № 2 и тщательно взболтать.

При дробном использовании планшета конъюгаты № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить в пластиковых ванночках, входящих в состав набора, в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

Во флакон с СБР добавить **650** мкл ТМБ и тщательно взболтать.

При дробном использовании планшета раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

Хранение: до 3 ч в защищённом от света месте при (18-25) °С.

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), концентрированные растворы конъюгатов (п. 7.2.3.)

Внимание! Промывочный раствор и концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °С.

7.3.2. Приготовить раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении (п. 7.2.3.).

7.3.3. В 1 лунку планшета внести 70 мкл K1+, в 1 лунку – 70 мкл K2+, в 2 лунки – по 70 мкл K-, в остальные лунки – по 70 мкл цельных тестируемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 70 мкл раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и од-

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

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 60 мин при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 45 мин при 600 об/мин и температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 2).

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 7 раз промывочным раствором.

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 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. При автоматической отмывке рекомендуется использовать опцию перекрестной аспирации.

Не допускать высыхания лунок планшетов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 20 мин при 600 об/мин и температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 2).

Внимание! При проведении анализа на автоматическом ИФА-анализаторе использовать только процедуру 2.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 7 раз промывочным раствором, как описано выше.

7.3.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении.

Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

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

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

Таблица расхода реагентов

Внимание! Возможно проведение не более 12 независимых постановок анализа, независимо от числа стрипов, используемых в каждой постановке.

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор.												
ФСБ-Тх25, мл	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дистиллированная вода, мл	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1200
Раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 1, мкл	k_1^*	$2 \times k_1$	$3 \times k_1$	$4 \times k_1$	$5 \times k_1$	$6 \times k_1$	$7 \times k_1$	$8 \times k_1$	$9 \times k_1$	$10 \times k_1$	$11 \times k_1$	$12 \times k_1$
РК № 1, мл	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5	4,2	4,9	5,6	6,3	7,0	7,7	8,4
Раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 2, мкл	k_2^*	$2 \times k_2$	$3 \times k_2$	$4 \times k_2$	$5 \times k_2$	$6 \times k_2$	$7 \times k_2$	$8 \times k_2$	$9 \times k_2$	$10 \times k_2$	$11 \times k_2$	$12 \times k_2$
РК № 2, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении.												
ТМБ, концентрат, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$k_1 = \bullet \bullet \bullet$ мкл

$k_2 = \bullet \bullet \bullet$ мкл

Значения коэффициентов k_1 и k_2 указаны в инструкции и в паспорте на данную серию наборов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^-$) не более 0,25;
- значение ОП в лунках с положительными контрольными образцами $K1^+$ и $K2^+$ не менее 0,8.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,1$$

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

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

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» обращаться:

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, 363-13-46.

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. отделения ИФА СПИД
ЗАО «Вектор-Бест»

Key

И.А. Костюкова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

Edw Kay

В.К. Ткачев

Ректор
ГБОУ ВПО СГМУ
им. В.И. Разумовского
Минздравсоцразвития России



В.М. Попков



Прошнуровано, прошито
и скреплено

С.А.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «__» _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1

«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для одновременного выявления антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке (плазме) крови. Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови, органов, тканей человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли (по 4 лунки в каждой постановке), возможны 12 независимых постановок по 8 анализов в каждой в ручном режиме или 1 постановка 96 анализов с использованием автоматических ИФА-анализаторов открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод выявления основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и моноклональных антител к антигену р24 ВИЧ-1. При наличии в исследуемых образцах антител к ВИЧ-1 или ВИЧ-2 они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета (первая инкубация), к образовавшемуся комплексу во время второй инкубации присоединяется конъюгат рекомбинантных белков ВИЧ с пероксидазой хрена. При наличии в исследуемом образце антигена р24 ВИЧ-1, он в ходе первой инкубации связывается с моноклональными антителами к р24, иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и одновременно с биотинилированными поликлональными антителами к р24, присутствующими в растворе. В ходе второй инкубации к образовавшемуся комплексу присоединяется конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина про-

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

исходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы антиген-антитело. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1 в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антителами к антигену р24 ВИЧ-1, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец № 1, содержащий антитела к ВИЧ-1, инактивированный ($K1^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- положительный контрольный образец № 2, содержащий рекомбинантный р24 ВИЧ-1, инактивированный ($K2^+$), готовый для использования – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), готовый для использования – 1 фл., 2,0 мл;
- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к р24 ВИЧ-1) – 1 фл.;
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза и рекомбинантные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 4,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РК № 1) – 1 фл., 9,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РК № 2) – 1 фл., 13 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипетки – 32 шт.;
- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-380: чувствительность по антителам к ВИЧ-1 – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-2 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-428: чувствительность по антителам к ВИЧ-2 – 100%.

3.3. Минимальная концентрация антигена р24 ВИЧ-1, достоверно определяемая набором, (чувствительность по антигену р24 ВИЧ-1) должна быть не выше 10 пг/мл.

3.4. Результат качественного определения набором антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1 должен соответствовать требованиям СПП 05-2-429: специфичность по антителам к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигену р24 ВИЧ-1 – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования МУ-287-113-00 и СП 1.3.2322-08.

4.4. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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 $(37 \pm 1)^\circ C$;

– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ C$;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом 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 планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- раствор дезинфицирующий.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы хранить при (2-8) °С, использовать в течение 1 мес.

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

При промывке лунки планшета заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета 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, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сы-вороток.

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

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

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

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема или содержимое флакона (28 мл) – до 700 мл.

Хранение: при (2-8)°С до 5 суток

7.2.2. Контрольные образцы.

Контрольные образцы (K1+, K2+, K-) готовы к использованию. Перед употреблением встряхнуть.

Хранение после вскрытия: при (2-8)°С до 3 мес.

7.2.3. Растворы конъюгатов.

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

Приготовить концентрированные растворы конъюгатов путем растворения содержимо-

го каждого флакона с конъюгатами № 1 и № 2 в 1 мл РПР.

Хранение: концентрированные растворы конъюгатов - при (2-8)°С до 1 мес. В случае более длительного хранения – при минус (18-40)°С. Допускается 5-кратное замораживание.

Внимание! Растворы конъюгатов № 1 и № 2 в рабочих разведениях готовить в пластиковых ванночках, входящих в состав набора, непосредственно перед использованием!

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата № 1 (см таблицу), добавить соответствующее количество РК № 1, тщательно перемешать пипетированием.

В другую пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата № 2 (см таблицу), добавить соответствующее количество РК № 2, тщательно перемешать пипетированием.

7.2.4. Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ (см таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: до 3 ч в защищённом от света месте при (18-25) °С.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор.												
ФСБ-Тх25, мл	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дистиллированная вода, мл	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1200
Раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 1, мкл	k_1*	$2 \times k_1$	$3 \times k_1$	$4 \times k_1$	$5 \times k_1$	$6 \times k_1$	$7 \times k_1$	$8 \times k_1$	$9 \times k_1$	$10 \times k_1$	$11 \times k_1$	$12 \times k_1$
РК № 1, мл	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5	4,2	4,9	5,6	6,3	7,0	7,7	8,4
Раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.												
Концентрированный раствор конъюгата № 2, мкл	k_2*	$2 \times k_2$	$3 \times k_2$	$4 \times k_2$	$5 \times k_2$	$6 \times k_2$	$7 \times k_2$	$8 \times k_2$	$9 \times k_2$	$10 \times k_2$	$11 \times k_2$	$12 \times k_2$
РК № 2, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении.												
ТМБ, концентрат, мкл	50	100	150	200	250	300	050	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$$k_1 = \bullet \bullet \bullet \text{ мкл} \quad k_2 = \bullet \bullet \bullet \text{ мкл}$$

Значения коэффициентов k_1 и k_2 указаны в инструкции и в паспорте на данную серию наборов.

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в целфеновый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°C до 1 месяца.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), концентрированные растворы конъюгатов (п. 7.2.3.).

Внимание! Промывочный раствор и концентрированные растворы конъюгатов должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °C.

7.3.2. Приготовить раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении (п. 7.2.3.).

7.3.3. В 1 лунку планшета внести 70 мкл K1+, в 1 лунку – 70 мкл K2+, в 2 лунки – по 70 мкл K⁻, в остальные лунки – по 70 мкл цельных тестируемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 70 мкл раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора. При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки поверхности лунки и сыворотки, находящейся в ней. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.

Лунки планшета заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 60 мин при температуре (37±1)°C (*процедура 1*) или при встряхивании на шейкере в течение 45 мин при 600 об/мин и температуре (37±1)°C (*процедура 2*).

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипа 7 раз промывочным раствором.

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

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Не допускать высыхания лунок планшетов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении.

Лунки планшета заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 1) или при встряхивании на шейкере в течение 20 мин при 600 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (процедура 2).

Внимание! При проведении анализа на автоматическом ИФА-анализаторе использовать только процедуру 2.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 7 раз промывочным раствором, как описано выше.

7.3.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении.

Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($\text{ОП}_{\text{ср}} \text{K}^-$) не более 0,25;

- значение ОП в лунках с положительными контрольными образцами K1^+ и K2^+ не менее 0,8.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} \text{K}^- + 0,1$$

Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если соответствующее ей значение $\text{ОП} \geq \text{ОП}_{\text{крит}}$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ.

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

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

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» обращаться:

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, 363-13-46.

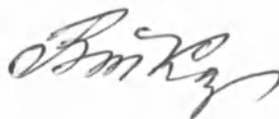
E:mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. отделения ИФА СПИД
ЗАО «Вектор-Бест»



И.А. Костюкова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Ректор
ГБОУ ВПО СГМУ
им. В.И. Разумовского
Минздравсопразвтия России



В.М. Попков

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
9 листов

