

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления суммарных антител к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

"БиоСкрин-ВИЧ"

ТУ 9398-017-10839330-2012

Е-0126 БиоСкрин-ВИЧ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов "БиоСкрин-ВИЧ" предназначен для выявления антител к вирусам иммунодефицита человека первого и второго типа в сыворотке или плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок полистироловых планшетов адсорбирована смесь рекомбинантных полипептидов - аналогов антигенов ВИЧ ("GagI", "EnvI" и "EnvII"), содержащих аминокислотную последовательность протективного белка (β -галактозидазы E.coli) и аминокислотные последовательности антигенных детерминант белков p24, p17, gp120 и gp41 ВИЧ-1 и gp110 и gp38 ВИЧ-2.

Положительный контрольный образец инактивированный K⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к ВИЧ и не содержащую антител к вирусу гепатита С, HBSAg и антигена ВИЧ. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K⁻ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к ВИЧ и не содержащую антител к вирусу гепатита С, HBSAg и антигена ВИЧ. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой рекомбинантные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (аналоги белков p17, p24, gp120, gp41, gp110 и gp38), связанные с ферментом пероксидазой хрена. Поставляется в виде концентрата.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Стоп-реагент представляет собой 1М раствор серной кислоты.

При инкубации образцов сыворотки в лунках планшета специфические к ВИЧ антитела одновременно связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе и в составе конъюгата, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. После отмывки неспецифической части антител и несвязавшейся части конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации специфических к ВИЧ антител в образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм). Его величина пропорциональна концентрации специфических к ВИЧ антител в образце сыворотки или плазмы крови человека.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в виде набора компонентов, упакованных в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	2 шт.
Положительный контрольный образец инаktivированный K ⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,7 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инаktivированный K ⁻	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	0,7 мл 1 пробирка
Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	от 1,0 до 1,5 мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для промывки планшетов (x25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от 35 °С до 37 °С в течение 30 минут.	25 мл 2 флакона
Раствор № 3 для разведения конъюгата	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	13мл 2 флакона
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	2,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из пластика для 8-ми канального дозатора.	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка	2 шт.

Один набор рассчитан на проведение 192 анализов сыворотки (плазмы), включая контрольные

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Чувствительность

Чувствительность на стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1, (ОСО 42-28-212-02П) и стандартной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-2, (ОСО 42-28-216-02) составляет 100 %.

3.2. Специфичность

Специфичность на стандартной панели сывороток, не содержащих антител к ВИЧ, (ОСО 42-28-214-02П) составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

Для проведения анализа необходимо использовать:

- дистиллированная или деионизированная вода;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 1000 мкл;
- пипетки 12-канальные (8-канальные) автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 100 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
- центрифуга настольная на 7-10 тыс. об/мин для получения и осветления образцов сыворотки/плазмы крови;

- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью 1,5-2,2 мл для получения, осветления и хранения образцов сыворотки/плазмы;
- мерный стакан или цилиндр вместимостью 500 мл;
- мерная посуда вместимостью до 25 мл;
- воздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывки планшетов;
- встряхиватель (шейкер) для планшетов (не обязательно);
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- контейнер для слива использованных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме 50 мкл.

В наборе могут быть исследованы образцы, содержащие цитрат натрия, гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянтов, а также образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием. Собранные образцы сыворотки или плазмы хранят при температуре от 4 °С до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше минус 15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более четырех планшетов.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в таблице № 1:

Таблица № 1

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 °С до 8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 3, № 4, хромоген	от 2 °С до 8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 °С до 8 °С	До окончания срока годности набора

Перед началом работы набор необходимо выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Растворы K⁺, K⁻, стоп-реагент поставляются в готовом виде. Перед использованием флакон с раствором № 3 интенсивно встряхнуть.

7.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов его следует прогреть перед разведением при температуре от 35 °С до 37 °С до полного растворения. 12 мл концентрата раствора № 1 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 300 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от 4 °С до 12 °С или 4 часа при температуре от 18 °С до 24 °С.

7.1.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

Из пробирки с концентратом конъюгата отобрать 0,2 мл в чистую емкость и добавить 12 мл раствора № 3. Тщательно перемешать.

Готовый раствор конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от 9 °С до 25 °С в защищенном от света месте.

7.1.3. Приготовление индикаторного раствора.

Отобрать 10 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 1 мл хромогена. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

7.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

7.2.1. Планшет с иммобилизованными антигенами (иммуносорбент) перед использованием однократно промыть рабочим раствором №1 автоматическим или ручным промывателем, полностью заполняя лунки раствором и выдерживая его в лунках не менее 15 сек. По окончании промывки тщательно удалить влагу из планшета.

7.2.2. В три лунки планшета внести по 50 мкл K^+ , в три лунки внести по 50 мкл K^- .

В оставшиеся лунки планшета внести по 50 мкл испытуемых образцов сывороток. Затем во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении (см. п.7.1.2.), не касаясь при этом сывороток и стенок лунок. Содержимое лунок перемешать с помощью встряхивателя.

Планшет заклеить пленкой и выдержать в течение 60 мин при температуре 37 °С. Не располагать планшеты стопкой!

7.2.3. Удалить жидкость из лунок промывателем. Внести рабочий раствор № 1 и сразу удалить его. Затем планшет 5-кратно промыть рабочим раствором № 1, каждый раз полностью заполняя лунки раствором и выдерживая раствор в лунках не менее 15 сек. Удалить влагу, как описано в п.7.2.1.

7.2.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п.7.1.3). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от 15 до 25 °С. Не располагать планшеты стопкой!

7.2.5. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно приступить к спектрофотометрическому определению оптической плотности (ОП). Учет результатов проводить при двух длинах волн 450 и 620-680нм при возможности одновременного двулучевого учета. Допускается учет результатов при одной длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты, полученные для контрольных образцов, должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОП в лунках с отрицательным контролем ОП _{ср} (K ⁻):	не более 0,15 о.е.;
среднее значение ОП в лунках с положительным контролем ОП _{ср} (K ⁺):	не менее 0,80 о.е.

При несоблюдении любого из этих требований анализ необходимо повторить. При соблюдении всех требований перейти к учету результатов анализа исследуемых образцов.

Рассчитать критическое значение ОП (ОП_{крит}) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + A,$$

где коэффициент $A = 0,18$

Результат исследования считается **положительным**, если ОП для исследуемого образца не менее ОП_{крит}.

Результат исследования считается **отрицательным**, если ОП для исследуемого образца менее ОП_{крит}.

Если ОП для исследуемого образца менее ОП_{крит}, но существенно превышает значения ОП для большинства образцов, рекомендуется исследовать этот образец повторно.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортировать и хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9 °С до 30 °С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждениях.

Рекламации на качество набора направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-56-05.

10. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.