УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» февраля 2024 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления антител к ВИЧ-1,2 и антигена p24 ВИЧ-1
(КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител к ВИЧ-1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 **«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»** *(далее по тексту – набор)* предназначен для одновременного иммуноферментного качественного определения антигена p24 ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1,2 *(включая ВИЧ-1 группу О)* в сыворотке *(плазме)* крови. Набор может быть использован для скрининга, включая скрининг доноров крови и её компонентов, тканей и органов, и в комплексной диагностике ВИЧ инфекции вне зависимости от популяционных и демографических аспектов.

1.2. Набор реагентов выпускается в трёх комплектациях, эквивалентных по назначению, свойствам и функциональным характеристикам:

Комплект 1 рассчитан на проведение 192 определений, включая контроли *(по 4 лунки в каждой постановке)*. Предусмотрено дробное использование набора.

Комплект 2 рассчитан на проведение 96 определений, включая контроли *(по 4 лунки в каждой постановке)*. Предусмотрено дробное использование набора.

Комплект 3 рассчитан на проведение 480 определений, включая контроли *(по 4 лунки в каждой постановке)*. Предусмотрено дробное использование набора.

1.3. Набор может быть использован для ручной постановки анализа и для постановки в автоматических ИФА-анализаторах открытого типа *(например, анализатор иммуноферментный автоматический «Лазурит» (LAZURITE) с принадлежностями)*.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ТЕСТА

ВИЧ-инфекция – инфекционное хроническое заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека, медленно прогрессирующее и характеризующееся поражением иммунной системы с развитием **синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД)**. Клиническими проявлениями несостоятельности иммунной системы являются оппортунистические инфекции, злокачественные новообразования, дистрофические и аутоиммунные процессы, что при отсутствии специфического лечения ведёт к гибели инфицированного человека. Основные пути передачи ВИЧ: при половом контакте, с кровью и её продуктами, от матери ребёнку [1,2].

ВИЧ-инфекцию вызывает РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству ретровирусов, роду лентивирусов. Существуют два типа вируса иммунодефицита человека, имеющие некоторые антигенные различия – ВИЧ-1 и ВИЧ-2; последний встречается преимущественно в странах Западной Африки [3]. По сравнению с ВИЧ-1, ВИЧ-2 менее контагиозен, для ВИЧ-2-инфекции характерна меньшая вирусная нагрузка и сниженная скорость развития заболевания.

К настоящему времени выделяют четыре группы ВИЧ-1: группа M *(«основная»)*, группа O *(«непохожая»)*, группа N *(«ни M, ни O»)* и группа P. Подавляющее большинство случаев инфицирования ВИЧ-1 вызвано вирусами группы M, внутри которой выделены различные субтипы *(от A до D, от F*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

до H, J, K), а также несколько циркулирующих рекомбинантных форм. Для ВИЧ-2 было описано семь субтипов *(от A до G)* [4].

Инкубационный период при ВИЧ-инфекции составляет от 4 недель до 3 месяцев, но в единичных случаях может увеличиваться до 1 года, в течение этого периода специфические антитела против вирусных белков не обнаруживаются [1]. Ранним маркером ВИЧ-инфекции является капсидный белок p24, который может быть обнаружен в образцах сыворотки или плазмы крови со 2-3 недели после инфицирования во время активного размножения вируса [5,6].

Стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции является определение антител и антигена ВИЧ с помощью диагностических тестов, одновременно выявляющих антитела к ВИЧ-1,2 и антиген p24 (ИФА и ИХЛА тесты четвертого поколения) [7, 8]. Использование комбинированных тестов четвертого поколения позволяет сократить «диагностическое окно» приблизительно на одну неделю по сравнению с тестами, выявляющими только антитела [9].

Скрининговое исследование на антитела к ВИЧ-1,2 и антиген p24 ВИЧ-1 является обязательным при медицинском обследовании доноров крови, органов и тканей [10] и ряда других групп лиц, определяемых в нормативной документации по профилактике ВИЧ-инфекции [7].

3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1. Принцип метода.

Метод выявления основан на твёрдофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов gp41 ВИЧ-1 и gp32 ВИЧ-2 и моноклональных антител к антигену p24 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 искусственных антигенов ВИЧ с пероксидазой хрена. При наличии в исследуемом образце антигена p24 ВИЧ-1, он в ходе первой инкубации связывается с моноклональными антителами к p24, иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и одновременно с биотинилированными поликлональными антителами к p24, 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 и антигена p24 ВИЧ-1 в анализируемых образцах. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты ИФА регистрируются измерением **оптической плотности (ОП)** в лунках планшета.

3.2. Состав набора

Компоненты набора имеют цветовую индикацию, флаконы с готовыми к использованию компонентами маркированы штрих-кодами.

Таблица 1

Компонент набора (сокращение) *Описание*	**Комплект 1 Σ 192**	**Комплект 2 Σ 96**	**Комплект 3 Σ 480**
Планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антителами к антигену p24 ВИЧ-1	2 шт.	1 шт.	5 шт.
Положительный контрольный образец № 1 ($К1^+$) *Жидкость тёмно-красного цвета.* *Содержит антитела к ВИЧ-1.* ***Содержит натрия азид (0,1%).***	1 фл., 1,5 мл	1 фл., 1,5 мл	1 фл., 1,5 мл
Положительный контрольный образец № 2 ($К2^+$) *Жидкость светло-красного цвета.* *Содержит рекомбинантный антиген p24 ВИЧ-1.* ***Содержит натрия азид (0,1%).***	1 фл., 1,5 мл	1 фл., 1,5 мл	1 фл., 1,5 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отрицательный контрольный образец (К¯) *Жидкость светло-жёлтого цвета.* *Не содержит антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антиген р24 ВИЧ-1.* ***Содержит натрия азид (0,1%).***	1 фл., 2,5 мл	1 фл., 2,5 мл	1 фл., 2,5 мл
Конъюгат № 1 *Аморфная масса зеленого цвета.* ***Биотинилированные антитела к р24 ВИЧ-1, лиофилизированный.***	1 фл.	1 фл.	2 или 3 фл.
Конъюгат № 2 *Аморфная масса белого или жёлтого цвета.* ***Стрептавидин-пероксидаза и искусственные антигены ВИЧ-1 и ВИЧ-2, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный.***	2 или 3 фл.	1 или 2 фл.	5 или 6 фл.
Раствор для предварительного разведения (РПР) *Бесцветная жидкость.* ***Содержит фенол (0,15%).***	1 фл., 10,0 мл	1 фл. 10,0 мл	1 фл., 10,0 мл
Раствор для разведения конъюгата № 1 (РК1) *Жидкость синего цвета.* ***Содержит натрия азид (0,01%).***	2 фл. по 13,0 мл	1 фл., 13,0 мл	3 фл. по 20,0 мл
Раствор для разведения конъюгата № 2 (РК2) *Жидкость оранжевого цвета.* ***Содержит натрия мертиолят (0,002%), фенол (0,125%).***	2 фл. по 15,0 мл	1 фл., 15,0 мл	4 фл. по 19,0 мл
Тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ, концентрат) *Бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.* ***Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,7%).***	1 фл., 1,5 мл	1 фл., 1,5 мл	1 фл. 3,5 мл
Субстратный буферный раствор (СБР) ***Бесцветная жидкость.***	2 фл. по 13,0 мл	1 фл., 13,0 мл	3 фл. по 20,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Бесцветная жидкость.* ***Содержит ProClin 300 (0,25%).***	2 фл. по 28,0 мл	1 фл. 28,0 мл	2 фл. по 100,0 мл
Стоп-реагент *Бесцветная жидкость.* ***Содержит кислоту серную (4,9%).***	1 фл., 21,0 мл	1 фл., 12,0 мл	3 фл. по 21,0 мл
Плёнки для заклеивания планшета	4 шт.	2 шт.	10 шт.
Ванночки для реагентов	4 шт.	4 шт.	4 шт.
Наконечники для дозаторов	32 шт.	32 шт.	32 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Предел обнаружения:

минимальная концентрация антигена р24 ВИЧ-1, определяемая набором по стандартной панели сывороток, содержащих р24 ВИЧ-1 в различных концентрациях*, не превышает 10 пг/мл *(0,50 МЕ/мл)* при процедурах 1, 2 и не превышает 5 пг/мл *(0,25 МЕ/мл)* при процедуре 3.

**аттестован относительно WHO International Standard HIV-1 P24 Antigen NIBSC code: 90/636.*

4.2. Диагностическая чувствительность:

при исследовании 500 серопозитивных образцов сыворотки *(плазмы)* крови составила 100% *(интервал 99,26%–100% с доверительной вероятностью 95%).*

4.3. Сероконверсионные панели:

чувствительность набора **«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»** в период сероконверсии оценивалась путём тестирования 2-х коммерческих сероконверсионных панелей: HIV Seroconversion Panel, Catalogue No: SCP-HIV-002 BIOMEX *(см. Таблица 2)* и HIV Seroconversion Panel, Catalogue No: SCP-HIV-005 BIOMEX *(см. Таблица 3), (45 образцов).*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2

Набор		КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ		Информация из паспорта к панели		
		Процедура 1	Процедура 3	Abbot Architect HIV Ag/Ab combo	Roche Elecsys HIV Ag	Diasorin Murex HIV 1.2.O
Маркер		**АГ+АТ**		**АГ+АТ**	**АГ**	**АТ**
№ образца	**День забора**	**Коэффициент позитивности (КП)**				
1	0	0,179	0,186	0,66	0,25	0,24
2	5	0,162	0,161	0,13	0,28	0,39
3	11	0,171	0,169	0,13	0,25	0,65
4	16	0,171	0,169	0,14	0,25	0,20
5	32	0,179	0,186	0,17	0,25	0,19
6	42	0,162	0,169	0,15	0,28	0,18
7	48	0,162	0,169	0,12	0,39	0,25
8	54	0,162	0,161	0,15	0,32	0,23
9	**61**	**5,385**	**7,390**	0,77	**1,06**	0,22
10	63	**12,667**	**14,415**	**3,40**	**4,14**	0,32
11	69	**21,410**	**27,025**	**4,20**	**5,52**	**8,92**
12	71	**17,265**	**22,051**	**2,84**	**1,71**	**1,67**
13	76	**33,795**	**33,322**	**18,00**	0,39	**4,98**
14	78	**33,812**	**33,492**	**17,19**	0,34	**8,59**
15	83	**33,222**	**33,525**	**16,73**	0,27	**8,65**
16	85	**33,812**	**33,517**	**16,60**	0,24	**8,67**
17	92	**33,790**	**33,525**	**8,60**	0,31	**8,79**
18	97	**33,810**	**33,534**	**11,01**	0,36	**8,95**
19	99	**33,800**	**33,525**	**13,83**	0,26	**9,01**
20	106	**32,880**	**33,534**	**16,89**	0,38	**8,83**

Примечание: HIV Seroconversion Panel, BIOMEX, Германия, Cat. No: SCP-HIV-002 Из 20 образцов плазмы крови, полученных от инфицированного ВИЧ пациента в течение 106 дней, 12 образцов определены как положительные в наборе «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3

Набор		КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ		Информация из паспорта к панели		
		Процедура 1	Процедура 3	Abbot Architect HIV Ag/Ab combo	Roche Elecsys HIV Ag	Diasorin Murex HIV 1.2.O
Маркер		АГ+АТ		АГ+АТ	АГ	АТ
№ образца	День забора	Коэффициент позитивности (КП)				
1	0	0,154	0,153	0,16	0,266	0,19
2	3	0,137	0,136	0,15	0,287	0,19
3	9	0,137	0,136	0,17	0,379	0,18
4	**13**	**3,376**	**5,254**	0,46	0,566	0,24
5	16	**33,812**	**33,525**	**27,33**	**35,240**	0,76
6	20	**19,624**	**24,788**	**4,08**	**5,900**	0,26
7	29	**33,333**	**33,525**	**42,49**	**17,460**	**8,95**
8	51	**33,812**	**33,525**	**15,65**	0,463	**9,02**
9	56	**33,692**	**33,483**	**25,95**	0,428	**8,91**
10	58	**33,299**	**33,042**	**31,46**	0,439	**8,79**
11	63	**32,547**	**32,907**	**41,95**	0,385	**8,83**
12	65	**33,573**	**33,297**	**46,51**	0,455	**8,91**
13	70	**33,812**	**33,525**	**60,78**	0,379	**9,00**
14	72	**33,812**	**33,517**	**58,23**	0,397	**9,16**
15	77	**33,812**	**32,966**	**62,47**	0,392	**8,96**
16	79	**33,821**	**33,449**	**65,14**	0,436	**8,94**
17	84	**33,803**	**33,331**	**69,93**	0,277	**8,95**
18	86	**33,821**	**33,051**	**42,90**	0,311	**8,73**
19	91	**33,231**	**32,254**	**67,79**	0,351	**8,77**
20	93	**33,821**	**33,525**	**71,80**	0,333	**8,81**
21	98	**33,812**	**33,517**	**77,60**	0,361	**8,86**
22	100	**33,812**	**33,525**	**80,70**	0,267	**8,86**
23	112	**33,795**	**33,508**	**92,99**	0,338	**8,69**
24	114	**33,803**	**33,508**	**92,19**	0,365	**8,67**
25	133	**33,795**	**33,305**	**93,61**	0,331	**8,74**

Примечание: HIV Seroconversion Panel, BIOMEX, Германия, Cat. No: SCP-HIV-005 Из 25 образцов плазмы крови, полученных от инфицированного ВИЧ пациента в течение 133 дней, 22 образца определены как положительные в наборе «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ».

4.4. Международный стандарт ВОЗ Антитела к ВИЧ *(1-ая международная референс-панель, NIBSC code: 02/210) (6 образцов).*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4

Образец	«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» АО «Вектор-Бест», Россия	
	Процедура 1	**Процедура 3**
	Коэффициент позитивности (КП)	
Анти-ВИЧ-1, субтип А, группа М	**33,795**	**33,017**
Анти-ВИЧ-1, субтип В, группа М	**32,521**	**33,483**
Анти-ВИЧ-1, субтип С, группа М	**33,786**	**33,492**
Анти-ВИЧ-1, субтип Е, группа М	**33,786**	**33,500**
Анти-ВИЧ-1, группа О	**33,795**	**33,508**
Анти-ВИЧ-2	**32,641**	**32,280**

Примечание: в состав панели входят 6 образцов, содержащих антитела к ВИЧ-1, субтипов А, В, С, Е группы М, антитела к ВИЧ-1 группы О и антитела к ВИЧ-2. Все образцы Международного стандарта ВОЗ Антитела к ВИЧ (1-ая международная референс-панель, NIBSC code: 02/210) определены как положительные в наборе «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ».

4.5. Диагностическая специфичность:

при исследовании 750 серонегативных образцов сыворотки *(плазмы)* крови составила 100% *(интервал 99,51%–100% с доверительной вероятностью 95%)*.

4.6. Аналитическая специфичность:

– при исследовании 460 образцов сыворотки *(плазмы)* крови пациентов, свободных от ВИЧ-инфекции, но содержащих HBsAg, антитела к другим патогенам: к вирусам гепатитов А, С, Е, вирусам простого герпеса 1 и 2 типа, цитомегаловирусу, к *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, антигену CagA *Helicobacter pylori*, к вирусу эндемического паротита, вирусу клещевого энцефалита, вирусу SARS-COV-2, а также сыворотки *(плазмы)* крови беременных женщин и пациентов с антителами к ревматоидному фактору не получено ложноположительных результатов, что свидетельствует об отсутствии кросс-реактивности и высокой специфичности.

4.7. Потенциально интерферирующие вещества:

– эндогенные: гемоглобин в концентрации до 5,0 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 40 мг/мл, общий белок в концентрации до 120 мг/мл;

– экзогенные: СМОФлипид в концентрации до 40 мг/мл; ацетилсалициловая кислота в концентрации до 1,5 мг/мл; аскорбиновая кислота в концентрации до 0,3 мг/мл; гепарин в концентрации до 6,0 МЕ/мл; альфа-интерферон в концентрации до 4000 МЕ/мл; рибавирин в концентрации до 1,8 мг/мл —

не оказывают влияния на результаты качественного определения антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1.

4.8. Воспроизводимость:

– для оценки воспроизводимости были исследованы три положительных образца с разной степенью позитивности.

Воспроизводимость внутри постановки оценивалась по 15 повторам каждого образца.

Воспроизводимость между постановками оценивалась в течение 5 дней, по 3 постановки в день *(3 серии различных вариантов комплектации, с интервалом не менее часа, в 3 различных помещениях)* с использованием 5 повторов каждого образца. Среднее значение коэффициентов позитивности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

($КП_{ср}$), стандартное отклонение, коэффициенты вариации при оценке воспроизводимости приведены в таблице 5.

Таблица 5

Образцы	Воспроизводимость					
	в пределах постановки n=15			между постановками n=75 (5×3×5)		
	$КП_{ср}$	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %	КПср	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
анти-ВИЧ-1	17,34	0,472	2,7	18,23	0,947	5,2
анти-ВИЧ-2	8,41	0,327	3,9	9,25	0,546	5,9
антиген р24 ВИЧ-1	4,12	0,203	4,9	4,40	0,327	7,4

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 *(Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).*

5.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

5.3. Стоп-реагент *(содержит кислоту серную)*, концентрат ТМБ *(содержит тетраметилбензидин)* обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента, концентрата ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть загрязненный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат натрия азид, натрия мертиолят, фенол, ProClin 300 в концентрациях, указанных в п. 3.2. «Состав набора».

Все компоненты, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы прогреванием.

5.4. При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом

5.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических *(профилактических)* мероприятий».

5.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5.7. Противопоказаний к применению медицинского изделия нет.

5.7. Противопоказаний к применению медицинского изделия нет.

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

6.1. <u>Для ручной постановки</u>:

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 700 об/мин и температуре (37±1) °С;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– промывочное устройство для планшетов;
– холодильник бытовой;
– дозаторы одноканальные и многоканальные со сменными наконечниками;
– перчатки медицинские диагностические одноразовые;
– цилиндр мерный вместимостью 5000 мл;
– вода дистиллированная;
– дезинфицирующие средства.
– бумага фильтровальная лабораторная.

6.2. <u>Для постановки с использованием автоматического ИФА-анализатора открытого типа:</u>

– автоматический ИФА-анализатор открытого типа *(например, анализатор иммуноферментный автоматический «Лазурит» (LAZURITE) с принадлежностями РУ № ФСЗ 2009/03660 от 07.04.2009);*
– холодильник бытовой;
– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками;
– перчатки медицинские диагностические одноразовые;
– цилиндр мерный вместимостью 5000 мл;
– вода дистиллированная;
– дезинфицирующие средства.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4–2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

7.2. Для анализа использовать образцы сыворотки, плазмы *(полученной с использованием в качестве антикоагулянтов гепарина, цитрата натрия, К2-ЭДТА или К3-ЭДТА)* крови человека.

7.3. Образцы сыворотки *(плазмы)* крови следует хранить при температуре (2–8) °С до 7 суток или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение. Допускается однократное замораживание. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

7.4. Образцы сыворотки *(плазмы)* крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7.5. Объём образца должен быть достаточным для проведения иммуноферментного анализа с учётом «мёртвого» объёма иммуноферментного анализатора.

8. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. **<u>ВНИМАНИЕ!</u> Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.**

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26) °С не менее 30 минут.
– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности набора.
– Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-реагента при температуре (2–30) °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Необходимо избегать воздействия прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.
– При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов *(ФСБ-Т×25; ТМБ, концентрат; СБР; стоп-реагент)*, которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».
– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.
– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать **одноразовые** наконечники для дозаторов.
– При использовании устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.
– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС *(четвертичных аммониевых соединений)*, спиртов, третичных аминов.
– В случае повторного использования посуду *(ванночки)* для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду *(ванночки)* для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду *(ванночки)* дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

8.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

8.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей необходимо прогреть его при температуре (30–40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 *(см. Таблица 6)* и довести дистиллированной водой до соответствующего объёма или содержимое 1 флакона 28,0 мл – до **700 мл**, 100,0 мл – до **2,5 л**. Тщательно перемешать.

Хранение: промывочный раствор хранить при температуре (2–8) °С не более 30 суток или при температуре (18–26) °С не более 7 суток.

8.4. Приготовление растворов конъюгата № 1 и конъюгата № 2 в рабочем разведении.

8.4.1. Приготовить концентрированный раствор конъюгата № 1 путём растворения содержимого флакона с конъюгатом № 1 в **1,0 мл РПР**.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата № 2 путём растворения содержимого флакона с конъюгатом № 2 в **1,0 мл РПР**.

Хранение: концентрированные растворы конъюгатов № 1 и № 2 хранить не более 1 месяца при температуре (2–8)° С. В случае более длительного хранения – при минус (18−40) °С, допускается 5-кратное замораживание.

8.4.2. В ванночку для реагентов отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата № 1 *(см. Таблица 6)*, добавить соответствующее количество РК № 1, тщательно перемешать пипетированием. В другую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата № 2 *(см. Таблица 6)*, добавить соответствующее количество РК № 2, тщательно перемешать пипетированием.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: растворы конъюгатов № 1 и № 2 в рабочем разведении стабильны до 10 часов при температуре (18–26) °С.

8.5. Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении.

В соответствии с числом используемых стрипов в ванночку для реагентов внести необходимое количество (см. таблицу расхода реагентов) концентрата ТМБ, добавить соответствующее количество СБР, перемешать пипетированием. Или внести 650 мкл/1,0 мл концентрата ТМБ во флакон с СБР, содержащий 13,0 мл/20,0 мл, соответственно.

Таблица 6

Расход реагентов на 1 планшет

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Тх25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
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	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 конъюгата № 2 в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата № 2, мкл	k_2*	$2\times k_2$	$3\times k_2$	$4\times k_2$	$3\times k_2$	$6\times k_2$	$7\times k_2$	$8\times k_2$	$9\times k_2$	$10\times k_2$	$11\times k_2$	$12\times k_2$
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 = ▲▲▲ мкл **k_2 = ▲▲▲ мкл**

Значения коэффициентов k1 и k2 указаны в инструкции и в паспорте на данную серию наборов.

Хранение: раствор ТМБ в рабочем разведении стабилен до 10 часов в защищённом от прямого солнечного света месте при температуре (18–26) °С.

8.6. Контрольные образцы: $К1^+$, $К2^+$ и $К^-$; стоп-реагент готовы к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Ручная постановка.

9.1.1. В одну лунку внести **70 мкл $К1^+$**, в одну лунку – **70 мкл $К2^+$**, в две лунки – по **70 мкл $К^-$**, в остальные лунки – по **70 мкл цельных тестируемых образцов сывороток** *(плазмы)* крови.

Контроли должны быть использованы в каждой постановке, на каждом планшете при использовании в постановке нескольких планшет.

Время внесения образцов не должно превышать **20 минут**.

9.1.2. Во все лунки внести по **70 мкл конъюгата № 1 в рабочем разведении**.

9.1.3. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать, используя по выбору какую-либо из следующих процедур:

– **60 минут** – в термостате при температуре (37±1) °С *(процедура 1)*;
– **40 минут** – в термошейкере при температуре (37±1) °С и 700 об/мин *(процедура 2)*;
– **60 минут** – в термошейкере при температуре (37±1) °С и 700 об/мин *(процедура 3)*.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.1.4. По окончании инкубации промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором *(см. п. 8.3)*, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок планшета. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки необходимо использовать перекрестную аспирацию жидкости из лунок *(режим «crosswise» или «cross aspiration»)* или тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

9.1.5. Во все лунки внести по **110 мкл конъюгата № 2 в рабочем разведении**.

9.1.6. Планшет заклеить пленкой и инкубировать:

– **30 минут** – в термостате при температуре (37±1) °С *(процедура 1)*;

– **25 минут** – в термошейкере при температуре (37±1) °С и 700 об/мин *(процедура 2);*

– **30 минут** – в термошейкере при температуре (37±1) °С и 700 об/мин *(процедура 3)*.

9.1.7. По окончании инкубации промыть лунки 5 раз промывочным раствором *(см. п. 9.1.4).*

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

9.1.9. Планшет инкубировать при температуре (18–37) °С в защищённом от прямого солнечного света месте **30 минут**.

9.1.10. Остановить реакцию добавлением в лунки по **100 мкл стоп-реагента.**

9.1.11. Измерить **оптическую плотность (ОП)** растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 10 минут.

9.2. Постановка в автоматическом ИФА-анализаторе открытого типа.

9.2.1. Подготовить ИФА-анализатор к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

9.2.2. Ввести в программу ИФА-анализатора протокол выполнения анализа *(п.п. 9.1.1–9.1.11)*, если он не был введён и сохранён ранее. Использовать **процедуру 2** или **процедуру 3.**

Примечание: возможна опция спектрофотометрического контроля внесения в лунки планшета:

– *исследуемых образцов – при длине волны 450 нм ОП в каждой из лунок, содержащих исследуемые образцы, должна быть больше 0,100;*

– *рабочего раствора конъюгата №1 – при длине волны 620 нм ОП в каждой лунке с внесенным раствором должна быть больше 0,300;*

– *рабочего раствора конъюгата №2 – при длине волны 450 нм ОП в каждой из лунок с внесенным раствором должна быть больше 0,500.*

9.2.3. Приготовить промывочный раствор *(п. 8.3),* растворы конъюгатов *(п. 8.4)* и ТМБ *(п. 8.5)* в рабочих разведениях. При подготовке компонентов необходимо учитывать «мёртвый» объём флаконов или ёмкостей, используемых для загрузки реагентов в ИФА-анализатор.

9.2.4. В соответствии с инструкцией по эксплуатации ИФА-анализатора поместить в него промывочный раствор, планшет, контрольные и исследуемые образцы; ёмкости с компонентами набора.

Инкубация планшет в автоматических ИФА-анализаторах проводится без заклеивания плёнкой.

9.2.5. Запустить протокол анализа в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматического ИФА-анализатора.

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с $К^-$ не более 0,15;

– значения ОП в лунках с $К1^+$ и $К2^+$ не менее 1,5.

Исследуемый образец расценивать как **положительный**, если соответствующее ему значение ОП превышает или равно величине $ОП_{крит.}$, которую вычисляют по формуле:

$$\mathbf{ОП_{крит.} = ОП_{ср.}К^- + 0{,}1},$$

где: $ОП_{ср.}К^-$ – среднее значение ОП для $К^-$.

Исследуемый образец расценивать как **отрицательный**, если соответствующее ему значение ОП менее величины $ОП_{крит.}$

Если ОП $К^-$ и $ОП_{иссл.обр.}$ имеют отрицательные значения, при расчёте $ОП_{крит.}$ и анализе результатов, считать их равными нулю.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для оценки степени позитивности положительных образцов может быть рассчитан **коэффициент позитивности (КП)** по формуле:

$$\mathbf{КП = ОП_{обр.}/ОП_{крит.}}$$

11. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

11.1. Для достижения заявленных характеристик теста необходимо строгое соблюдение инструкции.

11.2. Применение теста строго ограничено обнаружением антител к ВИЧ-1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 в сыворотке или плазме крови человека. Характеристики теста в отношении проб другой природы не установлены.

11.3. Антитела к ВИЧ-1,2 и/или антиген p24 ВИЧ-1 могут быть обнаружены в сыворотке, плазме крови человека у подавляющего большинства пациентов с ВИЧ-инфекцией, однако результаты теста могут быть отрицательными на ранней стадии инфекции, когда содержание антигена p24 и антител к ВИЧ-1,2 ниже определяемого набором уровня.

11.4. Положительный результат теста должен быть подтверждён согласно диагностическому алгоритму в подтверждающих тестах *(иммунный, линейный блот, определение РНК/ДНК ВИЧ молекулярно-биологическими методами)*. Для диагностики ВИЧ-инфекции у детей в возрасте до 18 месяцев, рождённых ВИЧ-инфицированными матерями, в связи с наличием материнских антител используют методы выявления ДНК/РНК ВИЧ.

Диагноз ВИЧ-инфекции устанавливается врачом-инфекционистом Центра по профилактике и борьбе со СПИД или иной уполномоченной специализированной медицинской организации путём комплексной оценки эпидемиологических данных, результатов клинического обследования и лабораторных исследований.

11.5. Возможны различия в определении наличия антител к ВИЧ-1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 в наборах реагентов разных производителей, что связано с различиями в используемых антигенах и антителах в составе наборов, разнообразием иммунологических реакций, возникающих у пациентов.

11.6. Отрицательный результат тестирования не исключает возможность наличия ВИЧ-инфекции.

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

12.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

12.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение набора по истечении срока его годности.

12.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

12.5. Набор предназначен для однократного применения.

12.6. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

12.7. Изделие нестерильно и не требует стерилизации.

13. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

13.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

13.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

13.3. Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

14. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у взрослых» *(утв. Минздравом России)* 2020.
2. Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у детей» (утв. Минздравом России) 2020.
3. Бартлетт Дж, Галлант Дж, Фам П. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. 2012. — М.: Р.Валент, 2012. — стр. 528.
4. Tebit DM, Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. Lancet Infect Dis. 2011; 11(1):45-56. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70186-9
5. Gray ER, Bain R, Varsaneux O, et al. p24 revisited: a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis. AIDS 2018; 32 (15): 2089–2102. doi: 10.1097/QAD.0000000000001982.
6. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS 2003;17(13):1871-1879. doi: 10.1097/00002030-200309050-00005.
7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 №4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»».
8. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.10.2020 № 1129н «Об утверждении Правил проведения обязательного медицинского освидетельствования на выявление вируса иммунодефицита человека *(ВИЧ-инфекции)*».
9. Alexander TS. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. Clin Vaccine Immunol. 2016 23(4):249–253. https://doi.org/10.1128/CVI.00053-16
10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.10.2020 № 1166н «Об утверждении порядка прохождения донорами медицинского обследования и перечня медицинских противопоказаний *(временных и постоянных)* для сдачи крови и *(или)* её компонентов и сроков отвода, которому подлежит лицо при наличии временных медицинских показаний, от донорства крови и *(или)* её компонентов».

По вопросам, касающимся качества набора ***«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ»****, обращаться в* ***АО «Вектор-Бест»*** *по адресу:*

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел./факс: (383) 252-51-62, 227-60-30.
тел./факс: (383) 252-51-81, тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30.
тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77.
E-mail: plkobtk@vector-best.ru
Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-60-34.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА

Набор реагентов «КомбиБест ВИЧ-1, 2 АГ/АТ»

*Использовать **только** после тщательного ознакомления с инструкцией!*

Внести: по **70 мкл К1^{+}, К2^{+}, К$^{–}$, исследуемых образцов**

Внести: по **70 мкл конъюгата №1 в рабочем разведении**

Инкубировать: ***процедура 1*** – термостат, **60 минут,** (37±1) °С или
процедура 2 – термошейкер, **40 минут,** (37±1) °С, 700 об/мин или
процедура 3 – термошейкер, **60 минут,** (37±1) °С, 700 об/мин,

Промыть: промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз

Внести: по **110 мкл конъюгата № 2 в рабочем разведении**

Инкубировать: ***процедура 1*** – термостат, **30 минут,** (37±1) °С, или
процедура 2 – термошейкер, **25 минут**, (37±1) °С, 700 об/мин, или
процедура 3 – термошейкер, **30 минут,** (37±1) °С, 700 об/мин,

Промыть: промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз

Внести: по **100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении**

Инкубировать: **30 минут,** (18–37) °С, в темноте,

Внести: по **100 мкл стоп-реагента**

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
REF	Номер по каталогу		Осторожно!
Σ	Содержимого достаточно для проведения n тестов	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии		Предел температуры
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до...		Обратитесь к инструкции по применению
YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате: Год-Месяц-День Год-Месяц		Не допускать воздействия солнечного света

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru