«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Генеральний директор
ТОВ «Бест Діагностик»
_____О.В. Шкурдай
«___» _____ 2012 р.

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів
для імуноферментного виявлення і підтвердження антитіл до ВІЛ-1,2
та антигену р24 ВІЛ-1

«ВІЛ-1,2 АГ/АТ-БЕСТ»

«ВІЛ-1,2 АГ/АТ-БЕСТ» являє собою набір, основою якого є синтетичні пептиди, котрі імітують антигени ВІЛ - 1 та ВІЛ - 2 й антитіла до ядерного антигену р24 ВІЛ-1, іммобілізовані на поверхні лунок планшета та входять до складу кон'югатів.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, (комплект 3) – 480 аналізів включаючи контролі. Всі набори стрипової комплектації.

Набір адаптований для постановки ІФА на аналітичних аналізаторах відкритого типу («MULTISCAN», виробник «Labsystems», «TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD» тощо).

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для одночасного виявлення антигену р24 ВІЛ-1 та антитіл класів IgA, IgM, IgG до ВІЛ-1(включаючи групу О) та ВІЛ-2 в сироватці (плазмі) крові. Рекомендовано для первинної лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції та обстеження донорів крові, органів, тканин людини.

Чутливість набору при визначенні антигену р24 ВІЛ-1 – 10 пг/мл.

Специфічність – 100%

СКЛАД НАБОРУ (з розрахунку на 1 планшет)

- **планшет-імуносорбент** з іммобілізованими синтетичними антигенами ВІЛ-1,2 і антитілами до р24 ВІЛ-1;
- **позитивний контрольний зразок № 1** інактивований **(К1+)**, що містить антитіла до ВІЛ-1, О і ВІЛ-1 – 1 фл.;
- **позитивний контрольний зразок № 2 (К2+)**, що містить синтетичний р24 ВІЧ-1– 1 фл.;
- **негативний контрольний зразок**, інактивований **(К–)** – 1 фл.;
- **кон'югат № 1** (біотинільвані антитіла до р24 ВІЛ-1) – 1 фл.;
- **кон'югат № 2** (стрептавідін-пероксидаза і синтетичні білки ВІЛ-1 і ВІЛ-2, мічені пероксидазой хріну) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 1 **(РРК1)** – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 2 **(РРК2)** – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном **(ФСБ-Тх25)** – 1 фл.;
- субстратний буферний розчин **(СБР)** – 1 фл.;
- тетраметілбензідін **(ТМБ)**, концентрат – 1фл.;
- **стоп-реагент** – 1 фл.;
- набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

Замість СБР та ТМБ виробник може включити до складу набору готову суміш СБР-ТМБ.

Дослідні зразки

Свіжовідібрані зразки сироватки (плазми) крові людини об'ємом не менш 70 мкл.

Допускається використання зразків, що зберігалися при (2-8)°С не більше 7 діб, або при мінус (20±3)°С, якщо необхідне триваліше зберігання. Допускається однократне розморожування зразків. Розморожені зразки перед використанням ретельно перемішати. Зразки, які містять осад центрифугувати протягом 10-15 хв. при 2500 — 3000 об/хв. Не можна використовувати пророслі, гемолізовані, гіперліпідні сироватки .

Заходи безпеки

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

"РУЧНА" ПОСТАНОВКА

Приготування робочих розчинів реагентів для ІФА

Перед роботою витягти набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі реагенти перед проведенням аналізу не менше 30 хв при температурі від 18 до 25 С.

Приготування робочого розчину для промивання (ФСБ-Т)

При випаданні осаду солей в ФСБ-Т (х25) прогріти його при температурі 37 С до повного розчинення осаду.

При постановці ІФА на 1 планшеті 40 мл ФСБ-Т (х25) розвести водою очищеною до 1000 мл.

При дробній постановці використовувати співвідношення обсягів ФСБ-Т (х25) і води, зазначені в табл.1 для необхідної кількості стрипів.

Таблиця 1

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ФСБ-Т(х25), мл	5	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37
Вода очищена, мл	до 125	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925

Готовий робочий розчин для промивання зберігати при температурі від 2 до 8 ºС не більше 14 діб.

Приготування робочого розчину кон'югату-1

Готувати не менше ніж за 10 хв до використання.

При постановці ІФА на 1 планшеті відібрати з флакона 390 мкл кон'югату-1, внести у флакон з РРК-1 і ретельно перемішати.

При дробній постановці кон'югат-1 розвести в РРК-1, використовуючи обсяги кон'югату-1 і РРК-1, зазначені в табл. 2 для необхідної кількості стрипів. , ретельно перемішати.

Таблиця 2

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
РРК-1, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
Кон'югат-1, мкл	**30**	**60**	**90**	**120**	**150**	**180**	**210**	**240**	**270**	**300**	**330**

Примітка: обсяги кон'югату-1 вказуються для кожної серії набору.

Робочий розчин кон'югату-1 допускається зберігати перед вживанням не менше 3 год при температурі від 18 до 25 С, розчин стабільний протягом 6 год при температурі від 2 до 8 С.

Приготування робочого розчину кон'югату-2

Готувати не менше ніж за 10 хв до використання.

При постановці ІФА на 1 планшеті відібрати з флакона *390* мкл кон'югату-2, внести у флакон з РРК-2 і ретельно перемішати.

При дробній постановці кон'югат-2 розвести в РРК-2, використовуючи обсяги кон'югату-2 і РРК-2, зазначені в табл. 3 для *необхідної кількості стрипів.* , ретельно перемішати.

Таблиця 3

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
РРК-2, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кон'югат-2, мкл	**30**	**60**	**90**	**120**	**150**	**180**	**210**	**240**	**270**	**300**	**330**

Примітка: обсяги кон'югату-2 зазначаються для кожної серії набору.

Робочий розчин кон'югату-2 допускається зберігати перед вживанням не менше
3 год. при температурі від 18 до 25 С, розчин стабільний протягом 6 год. при температурі від 2 до 8 С.

Приготування субстратно-індикаторного розчину

Готувати перед використанням у місці, захищеному від дії прямого сонячного світла. Під допоміжну пластикову ємність вносити спочатку СБР, а потім ТМБ, ретельно перемішати отриманий розчин

При постановці ІФА на 1 планшеті у флакон з СБР додати 1,040 мл ТМБ і ретельно перемішати.

При дробній постановці ТМБ внести в СБР, використовуючи обсяги ТМБ і СБР, зазначені в табл. 4 для *необхідної кількості стрипів* і ретельно перемішати

Таблиця 4

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
СБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ТМБ, мкл	80	160	240	320	400	480	560	640	720	800	880

Субстратно - індикаторний розчин допускається зберігати перед вживанням не менше 3 год. при температурі від 18 до 25 С в захищеному від світла місці, розчин стабільний протягом 6 год. при температурі від 2 до 8 С.

Приготування інших реагентів

К-, К + АТ, К + АГ, стоп-реагент готові до використання.

Після розкриття упаковок невикористані реагенти допускається зберігати в щільно закритих упаковках при температурі від 2 до 8 С до закінчення терміну придатності.

Проведення ІФА

Увага! Дотримання вказаних нижче температури і часу інкубації планшетів на кожній стадії постановки вкрай важливо для отримання достовірних результатів.

1. Витягти з упаковки рамку планшета і необхідне число стрипів. Невикористані стрипи допускається зберігати в щільно закритому пакеті з вологопоглиначем при температурі від 2 до 8 С до закінчення терміну придатності.

Планшет промити один раз робочим розчином для промивання шляхом несення в лунки 350-370 мкл розчину. При наявності промивача, що дозволяє виробляти промивку в режимі "Overflow", використовувати саме цей режим. Після закінчення промивання видалити залишки вологи з лунок, постукуючи планшетом по фільтрувальному папері.

2. В одну лунку внести 70 мкл К + АТ, в одну лунку - 70 мкл К + АГ, у дві лунки - по 70 мкл К-. В інші лунки внести по 70 мкл досліджуваних зразків.

Відразу після внесення контрольних та досліджуваних зразків внести в усі лунки планшета по 50 мкл робочого розчину кон'югату-1. На даному етапі спостерігається кольорова індикація. Вміст лунок перемішати обережним постукуванням по краях планшета.

3. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою. Інкубуйте 60 хв. при температурі 37 С в захищеному від світла місці.

4. За допомогою промивача видалити рідину з лунок, 6 разів промити планшет розчином для промивання, як зазначено в п. 1.

5. В усі лунки внести по 100 мкл робочого розчину кон'югату-2.

6. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою. Інкубуйте 30 хв. при температурі 37 С в захищеному від світла місці.

7. За допомогою промивача видалити рідину з лунок, 6 разів промити планшет як зазначено в п. 1.

8. В усі лунки внести по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину, планшет накрити кришкою або заклеїти клейкою плівкою, негайно помістити в захищене від світла місце і витримати 20 хв. при температурі 37 С.

9. У всі лунки (у тій же послідовності, з якою вносився субстратно-індикаторний розчин) внести по 100 мкл стоп-реагенту, обережно (постукуванням по планшету) перемішати вміст лунок і через 5 хв., але не більше ніж через 20 хв. приступити до обліку результатів.

Реєстрація та облік результатів

Результати ІФА реєструвати спектрофотометрично, вимірюючи оптичну густину (ОГ) при довжині хвилі 450 нм (допустимо використання фільтра порівняння з довжиною хвилі 620 або 630 нм). Нульовий рівень ("бланк") встановити по повітрю.

Результати ІФА враховуються при наступних умовах:

середнє значення ОГ в лунках з К-(ОГК- ср) не більше 0,2;

значення ОГ в лунках з К + АТ (ОГК + АТ) і К + АГ (ОГК + АГ) не менше 1,0.

Розрахувати ОГкрит за формулою: **ОГкрит = ОГК-ср + А, де А =** 0,150 (вказується для кожної серії набору).

Досліджувану сироватку розцінювати як позитивну, тобто містить антитіла до ВІЛ-1, О, та / або до ВІЛ-2, та / або антиген р24 ВІЛ-1, якщо ОГ досліджуваної сироватки дорівнює або перевищує ОГкрит.

Досліджувану сироватку розцінювати як негативну, якщо значення ОГ сироватки нижче ОГкрит.

ПОСТАНОВКА З ВИКОРИСТАННЯМ ІФА-АНАЛІЗАТОРІВ

Підготувати прилад відповідно до інструкції по його експлуатації, ввести програму аналізу, відповідну використовуваному набору, і провести аналіз.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 10 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 18 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися в ***ТОВ «Бест Діагностик» за*** *адресою:*

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9,

тел./факс: (044) 500-57-11

e-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції

Зведена таблиця приготування робочих розведень реагентів при дробових постановках

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Робочий промивоючий розчин (ФСБ-Т)												
ФСБ-Т(х25), мл	5	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищена, мл	до 125	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000
Робочий розчин кон'югату-1												
РРК-1, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,5
Кон'югат-1, мкл												
Робочий розчин кон'югату-2												
РРК-2, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Кон'югат-2, мкл												
Субстратно-індикаторний розчин												
СБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ, мкл	80	160	240	320	400	480	560	640	720	800	880	1040

Примітка: обсяги кон'югату-1 і кон'югату-2 зазначаються для кожної серії набору

КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ ІФА ("ВІЛ-1,2 АГ/АТ-БЕСТ")

Промити	1 раз розчином для промивання
Внести	В одну лунку - 100 мкл До АТ, в одну лунку - 100 мкл До АГ, у дві лунки - по 100 мклК-. В інші лунки по 100 мкл досліджуваних зразків. У всі лунки планшета - по 50 мкл робочого розчину кон'югату-1
Інкубація	60 хв, 37 ^{0}С
Промити	6 разів промиваючим розчином
Внести	по 100 мкл робочого розчину кон'югату-2 в кожну лунку
Інкубація	30 хв, 37 ^{0}С
Промити	6 разів промиваючим розчином
Внести	по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину в кожну лунку
Інкубація	20 хв., 37 ^{0}С
Внести	по 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку
Виміряти	ОГ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по повітрю