

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-ультра-БЕСТ»

«ВІЛ-1/2 АГ+АТ-ультра-БЕСТ» являє собою набір, основою якого є рекомбінантні 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 контролю. 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).

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для одночасного виявлення антигену р24 ВІЛ-1 та антитіл класів IgA, IgM, IgG до ВІЛ-1 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 – 5 пг/мл.

Специфічність – 100%

2. СКЛАД НАБОРУ (з розрахунку на 1 планшет)

- **планшет-імуносорбент** з іммобілізованими рекомбінантними антигенами ВІЛ-1,2 і антитілами до р24 ВІЛ-1 – 1шт.;
- позитивний контрольний зразок № 1, що містить антитіла до ВІЛ-1, інактивованій (K1+) – 1 фл.;
- позитивний контрольний зразок № 2, що містить рекомбінантний р24 ВІЛ-1 (K2+) – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивованій (K-) – 2 фл.;
- кон'югат № 1 (біотинільвані антитіла до р24 ВІЛ-1) – 1 фл.;
- кон'югат № 2 (стрептавідін-пероксидаза і рекомбінантні білки ВІЛ-1 і ВІЛ-2, мічені пероксидазою хрину) – 1 фл.
- розчин для попереднього розведення (РПР) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 1 (РК1) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 2 (РК2) – 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25) – 2 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР) – 1 фл.;
- тетраметілбензідін (ТМБ), концентрат – 1 фл.;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

3. 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 знезаразити відповідно до вимог чинного законодавства

3.1. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ (З РОЗРАХУНКУ НА 1 ПЛАНШЕТ)

3.1.1. Промиваючий розчин

Збовтати вміст флакону з ФСБ-Тх25. При випаданні в концентраті осаду солей прогріти його до повного розчинення осаду.

У відповідності з кількістю використаних стрипів відібрати необхідну кількість ФСБ-Тх25 (див. табл.) і розвести його дистильованою водою до вказаного в таблиці об'єму. Зберігання: при (2-8)°C до 72 год.

3.1.2. Контрольні зразки

Розчинити контрольні зразки К1+, К2+ і К-, додавши в кожен флакон по 1,0 мл РПР.

Зберігання: при (2-8)°C до 1 місяця.

3.1.3. Розчини кон'югатів

Увага! Для роботи з кон'югатами рекомендуємо використовувати одноразові наконечники для піпеток.

Приготувати концентровані розчини кон'югатів шляхом розчинення вмісту кожного флакона з кон'югатами № 1 та № 2 в 1 мл РПР.

Зберігання: концентровані розчини кон'югатів – при (2-8)°C до 1 міс. В разі тривалішого зберігання – при мінус 20°С. Допускається 5-кратне перемороження.

Увага! Розчини кон'югатів № 1 і № 2 в робочих розведеннях готувати безпосередньо перед проведенням ІФА!

Ретельно збовтати вміст флаконів з РК1 і з РК2.

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югату № 1 (див. таблицю), додати відповідну кількість РК1, ретельно перемішати піпетуванням.

У іншу пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югата № 2 (див. таблицю), додати відповідну кількість РК2, ретельно перемішати піпетуванням.

Таблиця витрат реагентів

	Кількість використовуваних стрипів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промиваючий розчин												
ФСБ-Тх25, мл.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дистильована 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
Розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні												
Концентрований розчин кон'югату № 1, мкл	α^*	2 α	3 α	4 α	5 α	6 α	7 α	8 α	9 α	10 α	11 α	12 α
РК1, 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
Розчин кон'югату № 2 в робочому розведенні												
Концентрований розчин кон'югату № 2, мкл	β^*	2 β	3 β	4 β	5 β	6 β	7 β	8 β	9 β	10 β	11 β	12 β
РК2, 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
Розчин ТМБ в робочому розведенні												
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

$$\alpha = 70 \text{ мкл} \quad \beta = 125 \text{ мкл}$$

3.1.4. Розчин ТМБ в робочому розведенні

Увага! Розчин ТМБ в робочому розведенні готувати безпосередньо перед використанням! Рекомендуємо виділити наконечники для піпеток, які використовувати лише для роботи з ТМБ.

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрату ТМБ (див. таблицю), додати відповідну кількість СБР, ретельно перемішати піпетуванням.

Увага! Допустиме блакитне фарбування розчину ТМБ в робочому розведенні, яке не робить впливу на результати аналізу.

Розчин стабільний в захищеному від світла місці при (18-25)°C до 3-х год.

3.2. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

3.2.1. Приготувати промиваючий розчин (п. 3.1.1), контрольні зразки (п. 3.1.2), концентровані розчини кон'югатів (п. 3.1.3).

3.2.2. Приготувати розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні (п. 3.1.3).

3.2.3. В одну лунку стрипа внести **70 мкл K1+**, в одну лунку – **70 мкл K2+**, в дві лунки – по **70 мкл K-**, в інші лунки – по **70 мкл** цільних тестованих сироваток.

Потім в усі лунки внести по **70 мкл** розчину кон'югату № 1 в робочому розведенні.

На даному етапі спостерігається зміна кольорової індикації.

Лунки заклеїти плівкою та інкубувати при **37°C 60 хв.**

За 5-10 хв. до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югата № 2 в робочому розведенні.

3.2.4. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємкість з дезінфікуючим розчином, промити лунки планшету 7 разів промиваючим розчином.

Увага! Кожну лунку при промиванні необхідно заповнювати повністю (**400 мкл промиваючого розчину**). Необхідно досягнути повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Час між заповненням і спорожненням лунок має бути не менше 30 сек.

Після закінчення промивання необхідно ретельно видалити вологу з лунок, постукуючи перевернутим планшетом по складеному в декілька шарів фільтрувальному паперу. Не допускати висихання лунок планшетів між окремими операціями при постановці реакції.

3.2.5. В усі лунки планшету внести по **100 мкл розчину кон'югату № 2** в робочому розведенні.

Заклеїти лунки плівкою та інкубувати при **37°C 30 хв.**

Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати у ємкість з дезінфікуючим розчином, лунки промити 7 разів промиваючим розчином, як описано вище.

3.2.6. Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 3.1.4).

В усі лунки внести по **100 мкл розчину ТМБ в робочому розведенні**.

Увага! Для внесення розчину ТМБ в робочому розведенні використовувати пластикову ванночку й одноразові наконечники, що входять до складу набору.

Планшет помістити в захищене від світла місце при **(18-25)°C на 30 хв.**

3.2.7. Зупинити реакцію додаванням в усі лунки по **100 мкл** стоп-реагенту і через 2-3 хвилини виміряти оптичну густину (ОГ).

Увага! Слід уникати попадання стоп-реагенту на одяг і відкриті ділянки тіла. При попаданні – промити великою кількістю води.

4. РЕЄСТРАЦІЯ ТА ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати ІФА реєструвати за допомогою спектрофотометру, вимірюючи оптичну густину (ОГ) в двох хвильовому режимі: основний фільтр – 450 нм, референс-фільтр – в діапазоні 620-650 нм. Допустима реєстрація результатів лише з фільтром 450 нм. Виведення спектрофотометру на нульовий рівень («бланк») здійснювати по повітрю.

Результати досліджень враховувати лише при дотриманні наступних умов:

- середнє значення ОГ в лунках з негативним контрольним зразком (ОГ_{сер K-}) не більше 0,25;
- значення ОГ в лунках з позитивними контрольними зразками K1+ і K2+ не менше 0,8. Досліджувану сироватку розцінювати **як позитивну**, якщо відповідне для неї значення ОГ перевищує або рівне ОГ_{крит}, яку розрахувати за формулою:

$$ОГ_{крит} = ОГ_{сер K^-} + 0,1.$$

5. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°C. Допускається транспортування при температурі до 25°C 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