

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення антитіл до ВІЛ-1,2 **«HIV-1/2»**

1. ПРИЗНАЧЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набір реагентів «HIV-1/2 - Бест» призначений для визначення антитіл до ВІЛ-1 (gp120, gp41, p24) subtype O та ВІЛ-2 (gp36) в сироватці або плазмі крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи.

- Діагностична специфічність набору «**HIV-1/2**» становить 100%.
- Діагностична чутливість набору «**HIV-1/2**» становить 100%.

2. СКЛАД НАБОРУ (З РОЗРАХУНКУ НА 1 ПЛАНШЕТ)

- **планшет-імуносорбент** з іммобілізованими синтетичними пептидами ВІЛ-1, ВІЛ-2 – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (**K+**) – 1 фл. або 2 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (**K-**) – 1 фл. або 2 фл.;
- **кон'югат** (білки кон'юговані з пероксидазою хрину до антитіл людини IgG) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для попереднього розведення (**РПР**) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (**РРК**) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для розведення сироватки (**РРС**) - 1 фл. або 2 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (**ФСБ-Тх25**) – 1 фл. або 2 фл.;
- субстратний буферний розчин (**СБР**) – 1 фл. або 2 фл.;
- тетраметілбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл. або 2 фл.;
- **стоп-реагент** – 1 фл. або 2 фл.;
- набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

3. СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ ТА 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

УВАГА! Ретельне дотримання описаних нижче вимог дозволить уникнути спотворення результатів ІФА.

- Для приготування розчинів і проведення ІФА слід використовувати чистий мірний посуд і автоматичні піпетки з погрішністю виміру об'ємів не більше 5%.
- Бажано використовувати свіжовідібрані зразки сироватки (плазми) крові. Допускається використання зразків, що зберігалися при (2-8)°C не більше 5 діб, або при мінус (20±3)°C, якщо необхідне триваліше зберігання.
- Сироватки, що містять зважені частки, можуть дати неправильний результат. Такі зразки перед використанням слід центрифугувати 10-15 хв. при 3000 об/хв.
- Не можна використовувати пророслі, гемолізовані, гіперліпідні сироватки або які не раз було заморожено та розморожено.
- Перед постановкою реакції всі компоненти набору необхідно витримати при температурі від 18 до 25°C не менше 30 хв.
- Ліофілізовані компоненти мають бути відновлені, як мінімум, за 15 хвилин до їх використання.
- Відразу після постановки реакції невикористаний планшет і щільно закриті флакони з вихідними компонентами необхідно помістити в холодильник (2-8)°C.
- Розчини ТМБ і кон'югату в робочому розведенні готувати безпосередньо перед використанням. Необхідно виключити дію прямого світла на розчин ТМБ .

- При промиванні лунки (стрипа, планшета) заповнювати повністю, не допускаючи переливання промиваючого розчину через краї лунок, не торкаючись лунок наконечником дозатора. Час між заповненням і спорожненням лунок має бути не менше 30 сек.
- При використанні автоматичного або ручного промивача необхідно стежити за станом ємкості для промивального розчину і сполучних шлангів: у них не повинно бути «заростів». Раз на тиждень бажано ємкість для промивального розчину і шланги промивати 70% спиртом.
- Не допускати висихання лунок планшета між окремими операціями.
- При постановці ІФА не можна використовувати компоненти з наборів різних серій або змішувати їх при приготуванні розчинів, окрім неспецифічних компонентів (ФСБ-Тх25, СБР, концентрат ТМБ, стоп-реагент), які взаємозамінні у всіх наборах ТОВ «Бест Діагностик»
- Забороняється повторне використання планшета для попереднього нанесення сироваток.
- При приготуванні розчинів і проведенні ІФА слід використовувати **одноразові** наконечники для дозаторів.
- Посуд (*ванночки*), який застосовується для роботи з розчинами кон'югату й ТМБ, не обробляти дезінфікуючими розчинами і миючими засобами.
- В разі повторного використання посуду (*ванночки*) для розчину кон'югату промити проточною водою й ретельно ополоснути дистильованою водою; посуд (*ванночки*) для розчину ТМБ відразу після роботи промити 50% розчином етилового спирту, а потім дистильованою водою.
- Для дезінфекції посуду та матеріалів, що контактують з досліджуваними й контрольними зразками, рекомендуємо використовувати дезінфікуючі засоби, що не надають негативної дії на якість ІФА, які не містять активний кисень і хлор, наприклад, комбіновані засоби на основі ЧАЗ (*четвертинних амонієвих з'єднань*), спиртів, третинних амінів.
- Піпетки та робочі поверхні обробляти лише 70% розчином етилового спирту. Не використовувати під час проведення ІФА перекис водню, хлорамін і т.д.

3.1. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

3.1.1. Промиваючий розчин

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

Відповідно до числа використовуваних стрипів відібрати необхідну кількість ФСБ-Тх25 (див. таблицю,) й розвести його дистильованою водою, до вказаного в таблиці об'єму або вміст одного флакона – до 700 мл.

Зберігання: при (2-8)°C до 72 год.

3.1.2. Розчини кон'югатів

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

Приготувати концентрований розчин кон'югату шляхом розчинення вмісту флакона з кон'югатом в 1 мл РПР.

Зберігання: концентрований розчин кон'югату – при (2-8)°C до 2 тижнів, при мінус 20°С – протягом 2-х місяців. Допускається 5-кратне заморожування.

Увага! Розчин кон'югату в робочому розведенні готувати в пластиковій баночці, що входить до складу набору, безпосередньо перед використанням!

Ретельно збовтати вміст флакона з розчином для розведення кон'югату (РК).

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югату, додати відповідну кількість РРК (див. таблицю), ретельно перемішати піпетуванням. Розчин кон'югату в робочому розведенні зберігання не підлягає.

3.1.3. Розчин ТМБ в робочому розведенні

Увага! Розчин ТМБ в робочому розведенні готувати в пластиковій ванночці, що входить до складу набору, 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 до неї відповідну кількість СБР, ретельно перемішати.

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

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

Таблиця витрат реагентів

	Кількість використовуваних стрипів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промиваючий розчин												
ФСБ-Т 25, 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 в робочому розчині												
Кон'югат у (концентрат), мкл	□*	2 □	3 □	4 □	5 □	6 □	7 □	8 □	9 □	10 □	11 □	12 □
РРК, 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 розчині												
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

□□□□▲▲▲ мкл

3.2. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Підготувати необхідну кількість стрипів до роботи. Що залишилися – відразу упакувати, щоб уникнути згубної дії вологу. Для цього стрипи помістити в цефлоновий пакет з вологопоглиначем, ретельно закрити пакет пластиковою застібкою. Упаковані таким чином стрипи зберігати при (2-8)°С протягом терміну придатності.

Приготувати промиваючий розчин (п. 3.1.1), контрольні зразки (п. 3.1.2).

В усі лунки внести по 30 мкл розчину для розведення сироваток (РС).

У 1 лунку стрипу внести 70 мкл К+, в 2 лунки – по 70 мкл К-, в останні лунки – по 70 мкл цільних тестованих сироваток.

Увага! Сироватки і контрольні зразки вносити до лунок акуратно, уникаючи розбризкування.

Лунки заклеїти плівкою та інкубувати при 37°С 1 годину.

За 1-2 хв. до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату в робочому розведенні (п. 3.1.2).

Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємкість з дезінфікуючим розчином, промити лунки планшета 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.

У всі лунки внести по 100 мкл розчину ТМБ в робочому розведенні.

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

Лунки заклеїти плівкою та інкубувати при 37°С 30 хв.

- Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємкість з дезінфікуючим розчином, промити лунки 7 разів промивальним розчином і видалити вологу з лунок як описано вище.

- Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 3.1.3). У всі лунки внести по 100 мкл розчину ТМБ.

Увага! Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванну і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

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

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

4. РЕЄСТРАЦІЯ ТА ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати ІФА реєструвати за допомогою спектрофотометру, вимірюючи оптичну густина (ОГ) в двоххвильовому 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 (ОГсер К-) не більше 0,25;
- середнє значення ОГ в лунках з позитивними контрольними зразками (ОГсер К+) не менше 0,8.

Досліджувану сироватку розцінювати як позитивну, якщо відповідне нею значення ОГ перевищує або рівне ОГкрит, яку розрахувати по формулі:

$$ОГ_{крит} = ОГ_{сер} К^- + 0,15.$$

5. 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