

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Тест-система імуноферментна для виявлення та підтвердження антитіл до окремих білків ВІЛ-1, ВІЛ-1 групи О та ВІЛ-2
«ВІЛ-1/2-БЛОТ-БЕСТ»

Призначення

Підтвердження та виявлення антитіл до окремих білків ВІЛ-1, ВІЛ-1 групи О та ВІЛ-2 в сироватці (плазмі) крові людини методом імуноного блотингу (формат "Вестерн-Блот") в зразках сироватки (плазми) крові людини. Можливе використання систем для автоматизації імуноного блотингу.

СКЛАД НАБОРУ

Імуносорбент – смуги (стрипи) з нітроцелюлозної мембрани білого кольору, шириною від 2,95 до 3,05 мм, довжиною від 7,0 до 12,0 см, с нанесеними на них у вигляді окремих поперекових смуг: рекомбінантних аналогів антигенів ВІЛ-1,2 - env 160, env 41, gag 1, pol 1, env 2; рекомбінантного антигена, що не містить антигенних детермінант ВІЛ, для контролю специфічності реакції (K_{AG}); антитіла проти IgG людини - сироватка діагностична моноспецифічна проти IgG людини – для контролю правильності проведення реакції (K_{реакції}).

Нанесені на стрипи антигени візуально не визначаються. Стрипи промарковані і знаходяться в пластиковому контейнері (пробірці з кришкою) – 24 стрипа.

K⁻ - контрольний негативний зразок - сироватка крові людини, що не містить антигени ВІЛ і антитіла до ВІЛ-1 та ВІЛ-2, не містить HBsAg і антитіла до вірусу гепатиту С, інактивована прогріванням при температурі 56 °С протягом 2 год, з вмістом гентаміцину сульфату в концентрації 0,1% та натрія азид в концентрації 0,1%; прозора синьо-фіолетового кольору рідина.

K⁺ - контрольний позитивний зразок - сироватка крові людини, що містить антитіла до ВІЛ-1,2 інактивована, прозора рідина розово-червоного кольору.

ПР_(концентратx25) – **25-кратний концентрат промивального розчину**; прозора злегка піноутворююча рідина.

РРЗ - розчин для розведення зразків; непрозора, піноутворююча світло-жовтого кольору рідина; при зберіганні можливе випадіння рихлого комкиутворюючого осаду різної інтенсивності, який легко розбивається при струшуванні.

РРК — розчин для розведення кон'югату

Кон'югат – моноклональні мишачі антитіла до IgG людини, мічені пероксидазою хрому, прозора рідина.

ТМБ - хромоген — розчин 3,3',5,5'-тетраметилбензидину; прозора світло-зелена рідина.

Також до набору входять планишети пластмасові з 8 або 6 канавками — 3 або 4 шт.;

Клейка плівка, пінцет пластиковий

ПРИНЦИП ДІЇ

В основі тесту лежить метод непрямого імуноферментного аналізу на нітроцелюлозній мембрані, на яку у вигляді окремих смуг нанесено рекомбінантні аналоги антигенів ВІЛ-1,О та ВІЛ-2, а також контролю специфічності та правильності проведення реакції.

При наявності в досліджуваному зразку антитіл до ВІЛ-1,О або ВІЛ-2 вони зв'язуються з антигенами ВІЛ-1,О, ВІЛ-2, нанесеними на стрип, утворюючи комплекс антиген-антитіло, котрий при внесенні в реакційне середовище кон'югату – моноклональні мишачі антитіла до IgG людини, які мічені пероксидазою хрому, утворюють комплекс антиген-антитіло-кон'югат, яке виявляється при кольоровій з ТМБ(забарвлення відповідної смуги на стрипі).

Антитіла до ВІЛ-1 виявляються при зв'язуванні з антигенами Env160 - gp120и gp41(ВІЛ-1,О), Env 41- gp41(ВІЛ-1), Gag 1- p24(ВІЛ-1), Pol1- p51(ВІЛ-1). Антитіла до до ВІЛ-2 при специфічному зв'язуванні з антигенам Env 2 - gp36(ВІЛ-2). Антитіла до ВІЛ-1 групи О виявляються при зв'язуванні з антигеном Env160 - gp120и gp41(ВІЛ-1,О).

Набір дозволяє проводити аналіз за двома протоколами:

- протокол №1 — 18-годинна інкубація;
- протокол №2 — 2-годинна інкубація.

АНАЛІТИЧНІ ТА ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діагностична чутливість набору – 100 %.

Діагностична специфічність – 100 %..

Маркування	
Зона env 160	
Зона env 41	
Зона gag 1	
Зона pol 1	
Зона env 41	
Зона контролю специфічності (K _{AG})	
Зона контролю реакції (K _{реакції})	

ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Для проведення дослідження використовують зразки сироватки або плазми крові людини об'ємом не менше 20 мкл. Тест бажано проводити з цільною сироваткою або плазмою крові людини, в котрій по результатам попереднього скрінінгового дослідження виявлено антитіла к ВІЛ-1. Зразки сироватки (плазми) зберігають при температурі від 2 до 8 °С не більше 7 діб; для більш довготривалого зберігання зразки потрібно зберігати при температурі мінус 20 °С. Допускається тільки однократне замороження-відтаювання досліджуваних зразків. Після розмороження зразки сироватки (плазми) крові потрібно від центрифугувати 3000 об/хв. протягом 10-15 хв.

ЗАСОБИ БЕЗПЕКИ ТА ОСНОВНІ ПРАВИЛА РОБОТИ З НАБОРОМ

Набір біологічно безпечний, але досліджувані зразки треба вважати як потенційно інфіковані:

Достовірність результатів залежить від виконання наступних правил:

- перед використанням набір реагентів потрібно витримати при кімнатній температурі (від 18 до 25 °С) не менше 30 хв.;
- при роботі зі стріпами користуватися гумовими рукавичками та пластмасовим пінцетом; при дотику пальців можуть залишатися плями.

ОБЛАДНАННЯ, МАТЕРІАЛИ ТА РЕАГЕНТИ

Для постановки аналізу необхідно наступні матеріали та обладнання:

Вода очищена (дистильована або де іонізована), 6% розчин перекису водню, одноразові рукавички, спирт етиловий 70%, піпетки автоматичні або напівавтоматичні зі змінним або постійним об'ємом, які дозволяють дозувати 20 мкл та 2,0 мл., наконечники одноразові на 0,5-250 мкл і 1-5 мл., центрифуга на 3-10 тис. об/хв.; мірний стакан або циліндр необхідного об'єму, контейнери для збору відходів (окремо для рідких та твердих), вата гігроскопічна, фільтрувальний папір, насос вакуумний, шейкер (20-60 коливань в хвилину), пластмасовий пінцет.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

1. Приготування розчинів та реагентів (витримати 30 хв. при кімнатній температурі)

1.1. Приготування робочого промивального розчину

Готується перед закінченням першого етапу інкубації (п. 2.4).

ПР_(концентрат x25) інтенсивно перемішайте (у разі випадіння осаду – прогрійте при 35-37°С протягом 30 хв. до повного розчинення солей). Відберіть необхідний об'єм ПР_(концентратx25) та доведіть до заданого об'єму водою очищеною (об'єми ПР_(концентратx25) та води, необхідні для постановки з використанням різної кількості стрипів, приведено в табл. 1). Отриманий розчин перемішайте.

Таблиця 1

Реагент	Об'єм реагенту, мл, на ...стріпів					
	6	8	12	16	18	24
ПР _(концентрат x25)	4,0	6,0	8,0	11	12	20
вода очищена	до 100	до 150	до 200	до 275	до 300	до 500

Готовий розчин зберігайте при кімнатній температурі не більше 48 год., при температурі від 2 до 8°С - не більше 14 днів.

При використанні автоматичного аналізатора вміст флакону ПР довести до 750 мл водою очищеною.

При першому використанні набору розчин готується до моменту закінчення першої інкубації (п.2.4).

1.2. Приготування робочого розчину кон'югату

Необхідний об'єм РРК перенести в чисту ємкість і додати необхідний об'єм кон'югату (об'єми кон'югату та РРК, необхідні для постановки з використанням різної кількості стрипів, приведено в табл. 2). Отриманий розчин перемішайте.

При використанні 24 стрипів необхідний об'єм кон'югату можливо внести безпосередньо у флакон з РРК.

Таблиця 2

Реагент	Об'єм реагенту, мл, на ...стріпів					
	6	8	12	16	18	24
РРК, мл	9	12	18	24	24	36
Кон'югат протокол №1 (18-годинна інкубація)	180	240	360	480	540	720
протокол №2 (2-годинна інкубація), мкл	360	480	720	960	1080	1440

При використанні автоматичного аналізатора у флакон з РРК (40 мл) внести 800 мкл кон'югату при дослідженні по протоколу №1 або 1600 мкл кон'югату при дослідженні по протоколу №2

Робочий розчин кон'югату готуйте безпосередньо перед використанням. Розчин стабільний протягом 15 хв. Розчин зберігання не підлягає. Об'єми кон'югату для кожної серії визначаються окремо.

1.3. Приготування інших реагентів

РРЗ, К+, К-, хромоген готові до використання

РРЗ перед використанням обов'язково стряхніть, т. я. при зберіганні можливе випадіння рихлого осаду різної інтенсивності, який легко розбивається при струшуванні.

2. Проведення аналізу

Протокол №1 (18-годинна інкубація)

2.1. Відкрийте упаковку стрипів. Пластмасовим пінцетом обережно покладіть стрипи маркірованою стороною вгору в канавки планшету

2.2. В усі канавки планшету внесіть по 1 мл РРЗ, витримайте 3-5 хв при струшуванні на шейкері при частоті обертів 40 об/хв.

УВАГА! Слідкуйте, щоб при інкубаціях і відмивках стрипи були повністю занурені у рідину, а реагенти, для уникнення змішування, не переливалися через бортики канавок.

2.3. Окремими наконечниками внесіть по 20 мкл контрольних сироваток (K⁺, K⁻) і досліджуваних зразків. Маркером провести розмітку канавок планшету в залежності від внесеного виду біологічних матеріалів.

УВАГА! Внесення сироваток повинно супроводжуватися швидким і ретельним перемішуванням автоматичною піпеткою. При внесенні кожної (досліджувана та контрольна) сироватки необхідно реєструвати номер відповідного їй стрипу.

2.4. Заклейте зайняті канавки клейкою плівкою або закрийте кришкою. Помістіть планшет на шейкер. Інкубуйте 18 год. при температурі 18-25 °С.

2.5. Невикористані реагенти набору під час інкубації з сироватками заберіть у холодильник.

2.6. За 5-10 хв. до закінчення інкубації по п. 2.4. приготуйте робочий промивний розчин (див. п. 1.1).

2.7. Після інкубації видаліть рідину з канавок планшету, використовуючи автоматичну піпетку або вакуумний насос, в ємність, котра містить дез. розчин.

УВАГА! Будьте обережні, щоб при видаленні розчинів не випав стрип. Наконечник відсмоктуючого пристрою після кожного контакту з різними зразками сироваток потрібно промивати дистильованою водою або використовувати для кожного зразка окремий одноразовий наконечник для уникнення перехресної контамінації. Слідкуйте, щоб краплі вологи не залишались під стрипом. При необхідності обережно підніміть стрипи пінцетом та видаліть з-під нього залишки вологи.

2.8. 4 рази промийте стрипи. Внесіть в усі канавки по 2,0 мл робочого промивного розчину (див. п. 1.1). При першій промивці розчин видаліть зразу після внесення, при всіх наступних промивках витримуйте стрипи в розчині 3-5 хв. при струшуванні. Видалення промиваючого розчину потрібно проводити обережно, див. п. 2.7. Стрипи між етапами промивки не повинні пересихати!

2.9. В усі канавки планшету внесіть по 1,0 мл робочого розчину кон'югату (див. п.1.2). Інкубуйте протягом 30 хв. при температурі 20-25 °С при струшуванні на шейкері при частоті обертів 40 об/хв.

2.10. Після інкубації видаліть рідину з канавок планшету, як зазначено в п. 2.7.

2.11. Промийте стрипи, як зазначено в п.2.8.

УВАГА! Промивку та видалення рідини після реакції з кон'югатом виконуйте особливо акуратно, т.я. навіть невеличкі залишки кон'югату при контакті з хромогеном можуть привести до неспецифічного забарвлення всього стрипу, а не окремих смуг.

2.12. Внесіть в усі канавки по 1,0 мл шойно приготовленого робочого розчину хромогену (див. п. 1.3). Інкубуйте 10-15 хв. в захищеному від світла місці при температурі 18-25 °С при струшуванні на шейкері при частоті обертів 40 об/хв. до з'явлення на стрипі забарвлених смуг.

2.13. Для зупинки реакції видаліть розчин хромогену (див. п. 2.7), додайте в кожную канавку планшету по 2,0 мл стоп-реагенту.

Витримайте 3-5 хв. при струшуванні, потім розчин видаліть (див. п. 2.7).

2.14. Промийте стрипи три рази дистильованою водою, наливаючи в кожную канавку по 2,0 мл води. Воду видаліть.

2.15. Розташуйте стрипи між двома листами фільтрувального паперу маркованою стороною догори, промокніть, покладіть в захищеному від світла місці до повного висихання.

Облік результатів потрібно проводити зразу після повного висихання.

Протокол №2 (2-годинна інкубація)

Виконати операція, зазначені в Протоколі №1 п.2.1 — 2.3.

В операції по п.2.4. Протоколу №1 заклейте зайняті канавки клейкою плівкою або закрийте кришкою. Помістіть планшет на шейкер. Інкубуйте 2 год. при температурі 20-25 °С.

Виконати операція, зазначені в Протоколі №1 п.2.7 — 2.8.

Як зазначено в п.2.9 Протоколу №1 в усі канавки планшету внесіть по 1,0 мл робочого розчину кон'югату (див. п.1.2). Інкубуйте протягом 1 год. при температурі 18-25 °С при струшуванні на шейкері.

Виконати операції, які описано в Протоколі №1 в 2.10 — 2.15

3. ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Облік результатів проводять при наступних умовах:

1. Контрольні зразки дають забарвлення смуг стрипів у відповідності з вимогами, які містяться в табл. 3.

Таблиця 3

Контрольний зразок	Смуги, які відповідають антигенам...						
	env160	env41	gag1	pol1	env2	K _{AG}	K _{реакції}
K ⁻	-	-	-	-	-	-	+
K ⁺	+	+	+або-	+або-	+	-	+

2. На стрипі повинна бути чітко забарвлена смуга контролю правильності проведення реакції (K_{реакції}) і не забарвлена смуга контролю специфічності реакції (K_{AG}).

В іншому випадку дослідження необхідно повторити.

Інтерпретація результатів

Результати дослідження зразка	Забарвлена смуга в зоні						
	env160	env41	gag1	pol1	env2	K _{AG}	K _{реакції}
Позитивний по ВІЛ-1	+	+	+ або -	+ або -	-	-	+
Позитивний по ВІЛ-2	-	-	+ або -	+ або -	+	-	+
Невизначений по ВІЛ-1	+	-	+ або -	+ або -	-	-	+
Невизначений по ВІЛ-2	-	+	+ або -	+ або -	-	-	+
Невизначений (можлива поява слабо забарвлених смуг (±) для сироваток, що не містить антитіла до ВІЛ)	-	-	±	-	-	-	+
	-	-	-	±	-	-	+
Негативний	-	-	-	-	-	-	+

Примітка:

"-" – відсутнє забарвлення смуги,

"+" – забарвлення смуги різної інтенсивності.

Якщо пройшло забарвлення смуги контролю специфічності реакції K_{AG}, це означає, що зразок дає неспецифічну реакцію, причиною якої є наявність великої кількості антитіл до бактеріальних антигенів або внаслідок недотримання правил приготування та зберігання сироваток.

При невизначеному результаті дослідження необхідно повторити зі зразком, який отримати через 3-4 тижня після першого дослідження.

УВАГА! Якщо невизначений результат отримано при постановці по Протоколу №2, рекомендується повторити дослідження по Протоколу №1

4. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 18 місяців з дня випуску.

*З питань, що стосуються якості набору, звертається 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 в разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції

	Протокол №1, 18-часова інкубація	Протокол №2, 2-часова інкубація
Внести	в лунки ванночок по одному стрипу для кожного контрольного та досліджуваного зразка; в кожен лунку – по 1 мл РРЗ	в лунки ванночок по одному стрипу для кожного контрольного та досліджуваного зразка; в кожен лунку – по 1 мл РРЗ
Інкубація	3-5 хв, 18-25 °С, на шейкері	3-5 хв, 18-25 °С, на шейкері
Внести	по 20 мкл контрольних та дослідних зразків	по 20 мкл контрольних та дослідних зразків
Інкубація	18 год, 18-25 °С, на шейкері	2 год, 18-25 °С, на шейкері
Промити	4 рази по 2,0 мл ПР	4 рази по 2,0 мл ПР
Внести	в кожен лунку по 1,0 мл робочого розведення кон'югату	в кожен лунку по 1,0 мл робочого розведення кон'югату
Інкубація	30 хв, 18-25 °С, на шейкері	1 год, 18-25 °С, на шейкері
Промити	4 рази по 2,0 мл ПР	4 рази по 2,0 мл ПР
Внести	в кожен лунку по 1,0 мл хромогену	в кожен лунку по 1,0 мл хромогену
Інкубація	15хв., 18-25 °С, на шейкері	15хв., 18-25 °С, на шейкері
Промити	1 раз ПР та 3 рази водою очищеною по 2,0 мл	1 раз ПР та 3 рази водою очищеною по 2,0 мл
Висушити стрипи між двома листами фільтрувального паперу та зареєструвати результати		