

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Тест-система імуноферментна для роздільного виявлення антитіл до ВІЛ 1/2 та антигену ВІЛ-1 (p-24)

«ВІЛ-1/2 АТ+АГ-діф-БЕСТ»

Призначення

Набір призначений для ідентифікації сумарних антитіл до окремих білків ВІЛ-1 - gp41env, gp120env, p24gag, p31pol, ВІЛ-1 групи О gp41env, ВІЛ-2 - gp36env і виявлення антигену ВІЛ-1 (p24) у сироватці (плазмі) крові людини з метою підтвердження позитивних або сумнівних результатів, отриманих при скринінгу сироваток крові людини в імуноферментних тест-системах для виявлення антитіл до ВІЛ-1,2 і для спільного виявлення антитіл до ВІЛ-1,2 і антигену p24 ВІЛ-1.

Чутливість набору для виявлення мінімальної кількості антигену p24 ВІЛ - 1 – 5 пг/мл або 0,25 МО/мл специфічність – 100%

Склад та комплектація набору:

Імуносорбент – полістиролові 96-лункові розбірні планшети, в лунках яких сорбовані рекомбінантні антигени, аналогічні білкам ВІЛ-1 - gp41, gp120, p24, p31; ВІЛ-1 групи О - gp41; ВІЛ-2 - gp36 і моноклональні мишачі антитіла до антигену p24 ВІЛ-1, кожен антиген і моноклональні антитіла сорбовані окремо на двох стріпах планшету;

Кон'югат-1 – моноклональні мишачі антитіла до антигену p24 ВІЛ-1, кон'юговані з біотином, ліофілізований;

Кон'югат-2 – суміш рекомбінантних антигенів: ВІЛ-1 - gp41, gp120, p24, p31, ВІЛ-1 групи О gp41, ВІЛ-2 - gp36, кон'югованих з біотином, ліофілізований;

Кон'югат-3 (концентрат x 11)– для виявлення антигену p24 ВІЛ-1– стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрону;

Кон'югат-4 – для виявлення антитіл до окремих білків ВІЛ-1 або ВІЛ-2 – стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрону, ліофілізований;

K^{+АТ} (контрольний позитивний зразок) – суміш сироваток крові людини, що містять антитіла до ВІЛ-1 і ВІЛ-2, або суміш сироватки крові людини, що містять антитіла до ВІЛ-1, і сироватки крові імунної кози, що містить антитіла до рекомбінантного антигену gp36 ВІЛ-2; (сироватка крові людини не містить HBsAg, антиген p 24 ВІЛ-1, антитіла до вірусу гепатиту С); інактивованій, рідкий;

K^{+АГ} (контрольний позитивний зразок) – очищений рекомбінантний антиген p24 ВІЛ-1 у сироватці крові людини, що не містить антитіла до ВІЛ-1,2, HBsAg, антитіла до вірусу гепатиту С; інактивованій, рідкий;

K⁻ (контрольний негативний зразок) – сироватка крові людини, що не містить антитіла до ВІЛ-1,2, антиген p 24 ВІЛ-1, HBsAg, антитіла до вірусу гепатиту С; інактивованій, рідкий;

РРК-3 – розчин для розведення кон'югату-3;

РРК-4 – розчин для розведення кон'югату-4;

ПР – промивальний розчин (концентрат x 25) – для промивання імуносорбенту;

СБ – субстратний буферний розчин;

ТМБ - хромоген, рідкий;

Стоп-реагент.

Набір розрахований на проведення 16 (8 x 2) визначень антитіл до ВІЛ-1,2 та антигену p24 ВІЛ-1, включаючи контрольні. Можливе часткове використання набору протягом терміну придатності.

Опис реагентів набору:

Імуносорбент – розбірний полістироловий 96-лунковий планшет з прозорими безбарвними лунками; на поверхню стріпів планшету з імобілізованими антигенами та антитілами нанесене кольорове маркування у вигляді кілець, що розміщуються по периферії лунок: на стріпах, призначених для визначення антитіл до gp41 – кільця червоного кольору, до gp120 - зеленого кольору, до p24 – синього кольору, до p31 – жовтого кольору, до gp36 – чорного кольору; на стріпах, призначених для визначення антигену p24 ВІЛ-1 – кільця білого кольору. Кольорове маркування може бути замінене етикетками або штампами з назвою визначуваних маркерів.

Кон'югат-1, ліофілізований- суха пориста аморфна маса зеленого кольору.

Кон'югат-2, ліофілізований - суха пориста аморфна маса оранжевого кольору.

Кон'югат-3 (концентрат x11) – прозора або злегка опалесцююча безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.

Кон'югат-4, ліофілізований - суха пориста аморфна маса білого або світло-жовтого кольору

K^{+АТ} (контрольний позитивний зразок) – прозора або злегка опалесцююча оранжевого кольору рідина.

K^{+АГ} (контрольний позитивний зразок) – прозора або злегка опалесцююча малиново-червоного кольору рідина.

K⁻ (контрольний негативний зразок) – прозора або злегка опалесцююча зеленого кольору рідина.

РРК-3 (розчин для розведення кон'югату-3) – прозора або опалесцююча рожевого кольору рідина.

РРК-4 (розчин для розведення кон'югату-4) – прозора або опалесцююча синього кольору рідина.

ПР (промивальний розчин, концентрат x 25) – прозора або злегка опалесцююча безбарвна або світло-жовтого кольору рідина, допустиме утворення осаду, що повністю розчиняється при температурі від 35 °С до 39 °С і струшуванні.

СБ (субстратний буферний розчин) – прозора безбарвна рідина.
ТМБ (хромоген) – прозора безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.
Стоп-реагент – прозора безбарвна рідина.

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

Обладнання та матеріали

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

1. Приготування 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.

2. Приготування робочих розчинів

Всі розчини необхідно відбирати одноразовими наконечниками!

Об'єми реагентів при проведенні аналізу на необхідній кількості стрипів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Таблиця витрат реагентів тест-системи

Кількість використуваних стрипів	ПР (робочий промивальний розчин)		СС		Робочий розчин кон'югату-3	
	ПР (конц х 25) (мл)	Вода очищена (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)	Кон'югат-3 (конц. х 11) (мл)	РРК-3 (мл)
6	40,0	960,0	0,50	5,0	0,05	0,5
12	80,0	1920,0	1,00	10,0	0,1	1,0

ПР - робочий промивальний розчин. Вміст флакону з концентратом промивального розчину ретельно перемішати. Необхідну кількість концентрату промивального розчину відібрати в окрему ємкість і розвести в 25 разів водою дистильованою. Отриманий розчин ретельно перемішати.

Зберігання: робочий промивальний розчин зберігати не більше 3-х діб при температурі від 2 до 8 °С.

К+_{AT} - контрольний позитивний зразок, готовий для використання.

К+_{AG} - контрольний позитивний зразок, готовий для використання.

К- - контрольний негативний зразок, готовий для використання.

РРК-3 - розчин для розведення кон'югату-3, готовий для використання. Перед використанням вміст флакону ретельно перемішати.

РРК-4 - розчин для розведення кон'югату-4, готовий для використання. Перед використанням вміст флакону ретельно перемішати.

Кон'югат-1, робочий розчин - готувати перед використанням. У флакон з ліофілізованим кон'югатом-1 додати воду дистильовану в об'ємі 0,5 мл, ретельно перемішати до повного розчинення. Перед використанням витримати не менше 10 хв. Зберігання: робочий розчин кон'югату-1 зберігати в захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

Кон'югат-2, робочий розчин - готувати перед використанням. У флакон з ліофілізованим кон'югатом-2 додати воду дистильовану в об'ємі 1,5 мл, ретельно перемішати до повного розчинення. Перед використанням витримати не менше 10 хв.

Зберігання: робочий розчин кон'югату-2 зберігати в захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

Кон'югат-3, робочий розчин - готувати перед використанням. Необхідну кількість РРК-3 перенести в чисту ємкість, додати відповідну кількість ретельно перемішаного концентрату кон'югату-3 (див. табл. 1) і обережно перемішати, не допускаючи спінювання (інтенсивне перемішування не застосовувати).

Перед використанням робочий розчин кон'югата витримати не менше 10 хв.

Зберігання: робочий розчин кон'югату-3 зберігати не більше 6 годин в захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

Кон'югат-4, робочий розчин - готувати перед використанням. У флакон з ліофілізованим кон'югатом-4 додати РРК-4 в об'ємі, вказаному на етикетці флакону з кон'югатом-4, ретельно перемішати до повного розчинення. Перед використанням робочий розчин кон'югату витримати не менше 10 хв.

Зберігання: робочий розчин кон'югату-4 зберігати не більше 6 годин в захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

СС – субстратна суміш - готувати перед використанням. Необхідну кількість СБ перенести в одноразову ємкість. Потім додати необхідну кількість ТМБ і ретельно перемішати.

Субстратна суміш має бути безбарвною!

Зберігання невикористаних реагентів: після розкриттям флаконів, реагенти набору, що залишилися невикористаними – ПР (концентрат х 25), кон'югат-3 (концентрат х 11), K_{+AT} , K_{+AG} , K^- , РРК-3, РРК-4, СБ, ТМБ, стоп-реагент - зберігати у флаконах, закритих гвинтовими кришками, впродовж терміну придатності набору при температурі від 2 до 8 °С.

3. Підготовка досліджуваних зразків

Для виключення помилкових результатів не можна піддавати досліджувані зразки сироваток крові людини термоінактивації, необхідно відбирати і зберігати їх в умовах, що запобігають бактеріальному росту

4. Проведення ІФА (відповідно до наведеної схеми внесення зразків)

При постановці ІФА рекомендовано використання термошейкера.

4.1. Перед проведенням ІФА розкрити фольгований пакет з імуносорбентом. Узяти необхідну кількість стрипів (6 або 12) і вставити їх в рамку.

4.2. Перед використанням імуносорбент промити 2 рази ПР, заливаючи його по самі вінця лунок (не менше 380 мкл в лунку), витримати 40 сек і видалити промивальний розчин за допомогою вошера в ємкість з дезінфікуючим розчином.

4.3. У лунки планшету внести дозатором піпеточним по 25 мкл кон'югатів в робочому розведенні: у лунки стрипів 1-5 і 7-11 – кон'югат-2, в лунки стрипів 6 і 12 – кон'югат-1. Не допускати контамінації стрипів 6, 12 (для визначення антигену р24) кон'югатом-2, що містить антиген р24.

4.4. Відповідно до схеми внесення зразків у лунки 1-5 стрипів горизонтального ряду А внести по 25 мкл K_{+AT} , в лунку 6-го стрипу того ж ряду внести 25 мкл K_{+AG} . У лунки 1-6 стрипів горизонтальних рядів В і С внести по 25 мкл K^- . У інші лунки 1-6 і 7-12 стрипів внести по 25 мкл досліджуваних зразків сироваток. Кожен зразок сироватки внести до 6 лунок імуносорбенту відповідно до наведеної схеми внесення зразків при постановці ІФА.

При внесенні негативного контролю і досліджуваних зразків сироваток до кожної з шести лунок імуносорбенту (див. схему внесення зразків) необхідно обережно піпетувати вміст кожної лунки і здійснювати зміну наконечника!

Зміну наконечників необхідно здійснювати для запобігання контамінації досліджуваного зразка і стрипів

Схема внесення зразків

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	АТ gp41	АТ gp120	АТ p24	АТ p31	АТ gp36	АГ p24	АТ gp41	АТ gp120	АТ p24	АТ p31	АТ gp36	АГ p24
А	K_{+AT}	K_{+AT}	K_{+AT}	K_{+AT}	K_{+AT}	K_{+AG}	6	6	6	6	6	6
В	K^-	K^-	K^-	K^-	K^-	K^-	7	7	7	7	7	7
С	K^-	K^-	K^-	K^-	K^-	K^-	8	8	8	8	8	8
Д	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9
Е	2	2	2	2	2	2	10	10	10	10	10	10
Ф	3	3	3	3	3	3	11	11	11	11	11	11
Г	4	4	4	4	4	4	12	12	12	12	12	12
Н	5	5	5	5	5	5	13	13	13	13	13	13

Після внесення сироватки зелений колір кон'югату-1 повинен змінитися на сірий (6 і 12 стрипи), оранжевий колір кон'югату 2 – на рожевий (1-5 і 7-11 стрипи). При тестуванні плазми або сироватки, що мають кислий рН, зелений колір кон'югату-1 і оранжевий колір кон'югату-2 стають жовтим. Деякі зразки плазми, що мають рН, близький до нейтрального, після внесення колір кон'югатів не змінюють.

Після внесення зразків планшет витримати 45 хв на шейкері при швидкості 500 об/хв і температурі (37,0±0,5) °С. Можлива інкубація планшету в термостаті при (37,0±0,5) °С протягом 1 год 30 хв. У цьому випадку після внесення зразків вміст лунок ретельно перемішати обережним постукуванням по краю планшету.

4.5. **Не видаляючи вмісту лунок і не промиваючи планшет**, у лунки 1-5 і 7-11 стрипів внести по 50 мкл кон'югату-4 в робочому розведенні, в лунки 6 і 12 стрипів внести по 50 мкл кон'югату-3 в робочому розведенні.

Кон'югати 3 і 4 вносити з обов'язковою зміною наконечників і обережним піпетуванням вмісту лунок.

Планшет витримати протягом 20 хв на шейкері при швидкості 500 об/хв і температурі (37,0±0,5) °С. Можлива інкубація планшету в термостаті при (37,0±0,5) °С протягом 30 хв. У цьому випадку після внесення кон'югату вміст лунок ретельно перемішати обережним постукуванням по краю планшету.

4.6. Вміст лунок видалити в ємкість з дезінфікуючим розчином і планшет промити 8 разів ПР, як в п. 4.2. Не допускати залишку рідини в лунках планшету!

4.7. У всі лунки стрипів внести по 100 мкл СС і витримати планшет протягом 20 хв в захищеному від світла місці за температури від 20 до 24 °С.

4.8. Реакцію зупинити додаванням в лунки по 150 мкл стоп-реагенту і через 2-3 хв провести облік результатів.

Схему проведення ІФА наведено у Додатку 1.

5. Облік результатів

Облік результатів слід проводити спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм і референс-світлофільтрі 620-680 нм з налаштуванням приладу «по повітрю». Допустимий облік результатів при одній довжині хвилі 450 нм.

Результати аналізу враховувати, якщо середні значення оптичної густини (ОГ) в лунках з K^- не більше 0,2, в лунках з K_{+AT} , K_{+AG} - не менше 0,8. Облік результатів аналізу зразків сироваток на наявність антитіл до кожного антигену ВІЛ 1 і ВІЛ 2 і антигену р24 слід проводити окремо. Результати аналізу слід вважати позитивними, якщо значення ОГ досліджуваного зразка вище ОГ крит.

ОГ крит. розраховувати за формулою:

ОГ крит. АТ gp41= ср. знач. ОГ К- (АТ gp41)+0,150
 ОГ крит. АТ gp120= ср. знач. ОГ К- (АТ gp120) +0, 150
 ОГ крит. АТ p24= ср. знач. ОГ К- (АТ p24) + 0,150
 ОГ крит. АТ p31= ср. знач. ОГ К- (АТ p31) +0,150
 ОГ крит. АТ gp36= ср. знач. ОГ К- (АТ gp36) +0, 150
 ОГ крит. АГ p24= ср. знач. ОГ К- (АГ p24) +0,100,

де 0,150 и 0,100 – коефіцієнти, встановлені методом статистичної обробки на підприємстві–виробнику, величини яких вказують для кожної серії в інструкції з використання, що вкладається в коробку з набором і в паспорті на серію даного препарату.

Критерії для інтерпретації отриманих результатів наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

**Критерії, що рекомендуються, для інтерпретації результатів
 “ ВІЛ-1/2 АТ+АГ-діф-БЕСТ”**

АТ gp41	АТ gp120	АТ p24	АТ p31	АГ p24	АТ gp36	Результат
+	+ 1 будь-який				-	позитивний по ВІЛ 1
+(-) 1 будь-який				+	-	позитивний по ВІЛ 1*
-	-	+(-)	+(-)	-	+	позитивний по ВІЛ 2
+	+	+	+	+(-)	+	позитивний по ВІЛ 1 або ВІЛ 1 і ВІЛ 2
Інші профілі						невизначений
-	-	-	-	-	-	негативний

Умови транспортування і зберігання

Зберігання та транспортування при температурі від 2 до 8 °С. Допускається транспортування при температурі від 9 до 25 °С протягом 10 діб, за температури не вище 28°С протягом 5 діб. Замороження не допускається.

Термін придатності – 18 місяців.

Після закінчення терміну придатності препарат використанню не підлягає.

Умова випуску. Для лікувально-профілактичних і санітарно-профілактичних установ.

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

Промити планшет	Робочий ПР, не менше 380 мкл, двічі
Внести	По 25 мкл робочих розчинів кон'югату-2 і кон'югату-1
Внести	По 25 мкл К⁺АТ, К⁺АГ, К-
Внести	По 25 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми)
Інкубувати	45 хв, (37,0 ± 0,5) °С, 500 об/хв, термошейкер або 1 год 30 хв, (37,0 ± 0,5) °С, термостат
Внести	По 50 мкл робочих розчинів кон'югату-4 і кон'югату-3
Інкубувати	20 хв, (37,0 ± 0,5) °С, 500 об/хв, термошейкер або 30 хв, (37,0 ± 0,5) °С, термостат
Промити планшет	Робочий ПР, не менше 380 мкл, 8 разів
Внести	По 100 мкл СС
Інкубувати	20 хв, 18-24 °С, у захищеному від світла місці
Внести	По 150 мкл стоп-реагента
Облік результатів	450 нм/620-680 нм або 450 нм