

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ «DIA-HIV-Ag/Ab»

Набір Т1-12

Т-1507

«DIA-HIV-Ag/Ab» – тест-система імуноферментна четвертого покоління для одночасного визначення антитіл специфічних до вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ 1/2) та корового антигену ВІЛ (p24).

### Призначення набору

Набір призначений для скринінгових та підтверджуючих досліджень сироватки та плазми крові людини на наявність корового антигену ВІЛ (p24) та сумарних антитіл (IgG, IgM, IgA), специфічних до ВІЛ 1/2.

### Принцип аналізу

Головні компоненти набору - імуносорбент та імуноферментні кон'югати. Імуносорбент - полістироловий планшет, лунки якого сенсифілізовані моноклональними антитілами до антигену ВІЛ – p24 та рекомбінантними білками – аналогами антигенів ВІЛ-1 та ВІЛ-2 – env-1 та env-2, відповідно. Імуноферментні кон'югати – біотинільовані поліклональні антитіла до корового антигену ВІЛ – p24, рекомбінантні антигени env-1 та env-2, кон'юговані з пероксидазою хрому та пероксидазний кон'югат стрептавідину.

При внесенні в лунки планшету зразків сироваток інфікованої крові антиген p24 зв'язується як зі специфічними антитілами на твердій фазі так і з поліклональними біотинільованими анти-p24 антитілами в складі кон'югату №1, а специфічні до ВІЛ антитіла зв'язуються як з рекомбінантними антигенами env1 та env2 сорбованими на твердій фазі так і з антигенами в складі пероксидазного кон'югату (№1), утворюючи комплекси антиген-антитіло. Імунні комплекси анти-p24 специфічних антитіл та антигену p24 в подальшому виявляються кон'югатом стрептавідину з пероксидазою (№2). Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додають розчин проявника – субстрату пероксидази (перекис водню) та хромогену (3,3',5,5'-тетраметилбензидин - ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках при довжині хвилі 450/620 нм. Інтенсивність забарвлення в лунках визначається присутністю анти-ВІЛ специфічних антитіл або антигену p24.

### Склад набору

До складу набору входять:

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	1 шт.
2	Позитивний контроль Ab	1 амп. по 1,4 мл
3	Позитивний контроль Ag	1 амп. по 1,4 мл
4	Негативний контроль	2 амп. по 2,0 мл
5	Концентрат кон'югату №1 (11x)	1 амп. 0,8 мл
6	Концентрат кон'югату №2 (11x)	1 амп. 1,5 мл
7	Концентрат розчину для промивання (31x)	2 фл. по 25 мл
8	Розчин для розведення кон'югату №1	1 фл. по 8 мл
9	Розчин для розведення кон'югату №2	1 фл. по 15 мл
10	Субстратний буфер	1 фл. по 7 мл
11	Розчин ТМБ	1 фл. по 7 мл
12	Стоп-реагент	1 фл. по 15 мл
13	Клейка плівка	3 шт.

## Додаткові реактиви, матеріали

### та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (30-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу відроблених забруднених рідин.

### Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120 °С;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Вимоги до промивання планшета:

- неякісне промивання планшета призводить до одержання некоректних результатів;
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганій роботі можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

### Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми зберігають при температурі 2-8°С протягом 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°С) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, центрифугуванням.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням непридатні для аналізу.

### Проведення аналізу

#### 1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 8 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°С протягом 30 хвилин.

##### 1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 2 мл концентрату і розчиняють в 60 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°С до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°С не більше 5 діб.

##### 1.2 Приготування розчину кон'югату №1

В чистий флакон відбирають 0,5 мл розчину для розведення кон'югату №1 (синій колір) та додають 50 мкл концентрату кон'югату №1(синій колір). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

### 1.3 Приготування розчину кон'югату №2

В чистий флакон відбирають 1,0 мл розчину для розведення кон'югату №2 (червоний колір) та додають 100 мкл концентрату кон'югату №2 (червоний колір). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

### 1.4 Приготування ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 0,5 мл хромогену ТМБ, додають 0,5 мл субстратного буферу, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно застерігати від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

## 2 Проведення аналізу

- Перед проведенням аналізу звільняють необхідну кількість стрипів від упаковки, вставляють їх в рамку. Стрипи, які не використовуються в даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8°C протягом одного місяця.
  - Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.
  - Готують розчин кон'югату №1 (синій колір) згідно п. 1.2.
  - В лунки вносять по 100 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).
  - В одну лунку (А1) вносять 100 мкл позитивного контролю Ab, в наступну лунку (В1) вносять 100 мкл позитивного контролю Ag, а в три інші (С1-Е1) - по 100 мкл негативного контролю.
  - Додають в кожну лунку поверх досліджуваних та контрольних зразків сироваток по 30 мкл розчину кон'югату №1. По закінченні внесення кон'югату перемішують вміст лунок (при малій амплітуді потрушування) протягом 15-20 сек.
  - Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують їх при 42 °C у термостаті протягом 60 хвилин.
  - Після закінчення інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються залишків вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
  - Готують розчин кон'югату №2 (червоний колір) згідно п. 1.3.
  - В усі лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату №2.
  - Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують їх при температурі 18-25 °C протягом 15 хвилин.
  - Після закінчення інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються залишків вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
  - Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.4.
  - Вносять в лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.
  - Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують їх при 18-25 °C в темному місці протягом 30 хвилин.
  - Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
  - Не більше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину в лунках у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).
- Оптичну густину можна визначити в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.*

## Облік та інтерпретація результатів аналізу

- Розраховують середнє значення оптичної густини (ОГ) для лунок негативного контролю (ОГсер К-).
- Проведення аналізу вважають коректним, якщо оптична густина позитивних контролів К+Ab, К+Ag не нижче 0,6 оптичної одиниці (ОО), а значення ОГсер К- не вище 0,15 ОО. Якщо одне з трьох значень ОГ негативного контролю більше ніж 0,15 ОО, або більш ніж в 2 рази відрізняється від середнього значення негативного контролю (тобто, не відповідає вимогам  $0,5 \times \text{ОГсер К-} \leq \text{ОГК-} \leq \text{ОГсер К-} \times 2$ ) його відкидають і розраховують ОГсер К- за рештою значень ОГ К-.
- Гранічне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину 0,20 до значення ОГсер К-.
- "Сіра зона" - зона значень ОГ, що знаходяться в діапазоні від ГЗ до значень менших ГЗ на 10%.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше нижнього рівня ОГ "сірої зони".
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.
- Зразки зі значеннями оптичної густини в межах «сірої зони» вважаються **невизначеними**.
- Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не менш ніж в двох лунках тест-системи:
  - зразки позитивні в одній або більше лунках слід вважати позитивними в тест-системі **DIA-HIV-Ag/Ab**;
  - зразки негативні в двох або більше лунках слід вважати негативними в тест-системі **DIA-HIV-Ag/Ab**.

Всі зразки, що при повторному аналізі були позитивними мають бути перевірені верифікаційними (підтверджуючими) тестами. Зважаючи на високу чутливість тест-системи **DIA-HIV-Ag/Ab** на стадії ранньої сероконверсії, до підтверджуючих досліджень слід залучити тест-системи для визначення антигену ВІЛ р24, наприклад **DIA-HIV-p24**.

## Форми випуску набору

- **набір Т2** – 2 монолітних планшети, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на проведення 2 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);  
Набір розраховано на проведення 192 аналізів (включаючи контролі).
- **набір Т1-12** – 1 стриповий планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 12 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок).  
Набір розраховано на проведення 96 аналізів (включаючи контролі).
- **набір Т24** – 2 стрипових планшети, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 24 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок).  
Набір розраховано на проведення 192 аналізів (включаючи контролі).

## Умови зберігання та транспортування

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8°C. Заморозувати набір не дозволяється. Термін зберігання набору – 1 рік.

**Рекламації** на якість наборів надсилайте до ДП "Центр імунобіологічних препаратів" за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та до АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“ за адресою: 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицького, 35; тел./факс (044) 433-75-82.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА рекламації не приймаються.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 (АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“) або e-mail: tech@diapr.kiev.ua.