

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення та підтвердження  
наявності антигену р24 ВІЛ-1

### **ВІЛ-1 р24-антиген-ІФА-БЕСТ**

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір «ВІЛ-1 р24-антиген-ІФА-БЕСТ» призначений для імуноферментного виявлення та підтвердження наявності антигену р24 ВІЛ-1 в сироватці або плазмі крові людини.

Набір розраховано на проведення 96 аналізів в режимі виявлення р24-антигену або 48 аналізів в режимі підтвердження, включаючи контролю. Для дослідження невеликої партії проб в режимі виявлення можливі 12 незалежних постановок ІФА по 8 аналізів, включаючи контролю (3 на кожну постановку), в режимі підтвердження – 6 незалежних постановок по 8 аналізів, включаючи контролю (3 на кожну постановку).

#### 2. ПРИНЦИП ДІЇ

Принцип методу виявлення полягає у взаємодії антигену р24 ВІЛ-1 з досліджуваного зразка з моноклональними антитілами, іммобілізованими в лунках полістиролового планшету. Антиген, що зв'язався, виявляють за допомогою біотинілірованих анти-ВІЛ-1 антитіл і кон'югата стрептовідин з пероксидазою хрому.

Підтвердження наявності р24 ВІЛ-1 здійснюється методом конкурентного імуноферментного аналізу, заснованого на принципі нейтралізації р24-антигену специфічними антитілами.

#### 3. СКЛАД НАБОРУ

- планшет розбірний з іммобілізованими моноклональними антитілами до ядерного антигену р24 ВІЛ-1 – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований, що містить рекомбінантний р24 ВІЛ-1 в концентрації 160 пг/мл (К+), прозора червоного кольору рідина – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (К-), прозора жовтого кольору рідина, 1 фл.;
- кон'югат №1, концентрат (*біотинільвоні антитіла до р24 ВІЛ-1*), синього кольору рідина 1 фл.,
- кон'югат №2, концентрат (*стрептавідин-пероксидаза*), прозора помаранчевого кольору рідина 1 фл.,
- розчин для розведення кон'югату № 1 (РК № 1), прозора світло-сірого кольору рідина – 1 фл.,
- розчин для розведення кон'югату № 2 (РК № 2), прозора безбарвна або з жовтизою рідина – 1 фл.,
- розчин підтверджуючого агента (*антитіла до р24 ВІЛ-1*) (РПА), зеленого кольору рідина – 1 фл.,
- розчин для розведення зразків (РРЗ), прозора ясно-зеленого кольору рідина – 1 фл.,
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25), прозора або злегка опалесцентна безбарвна рідина; можливе випадання осаду солей, що розчиняється при нагріванні до (30-40)°С. – 2 фл.;
- тетраметілбензідін (ТМБ), концентрат – прозора безбарвна рідина – 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР), прозора безбарвна рідина – 1 фл.;
- стоп-реагент, прозора безбарвна рідина – 1 фл.,
- набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

#### 4. АНАЛІТИЧНІ ТА ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість по антигену р24 ВІЛ-1 яка достовірно визначається набором, складає 2-3 пг/мл.

Специфічність по антигену р24 ВІЛ-1 – 100%

#### 5. УСТАТКУВАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

#### 6. ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Бажано використовувати щойно відібрані зразки сироватки (*плазми*) крові. Допускається використання зразків, що зберігалися при температурі від 2 до 8°С не більше 5 діб, або при мінус (20±3)°С, якщо необхідне більш тривале зберігання. Зразки не можна нагрівати вище 40°С.

Уникати повторних циклів заморожування/відтаювання. Зразки не можна досліджувати після 3 таких циклів.

Не можна використовувати порослі, гемолізовані, гіперліпідні сироватки.

Сироватки, що містять зважені частки, можуть дати неправильний результат. Такі зразки перед використанням слід центрифугувати 10-15 хв. при 3000 об/хв.

#### 7. 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.

## 8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Для приготування робочих реагентів необхідно користуватися таблицею витрат компонентів (таблиця 1).

### 8.1. Промиваючий розчин.

Збовтати вміст флакона з ФСБ-Тх25. При випаданні осаду солей в концентраті прогріти його перед використанням до повного розчинення осаду. Відповідно до числа використовуваних стріпів відібрати в чисту ємкість необхідну кількість ФСБ-Тх25 (див. таблицю) і розвести його дистильованою водою до вказаного в таблиці об'єму, ретельно перемішати.

Зберігання: при (2-8)°С до 72 год.

### 8.2. Розчини кон'югатів

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

Розчини кон'югатів № 1 та № 2 в робочих розведеннях готувати в пластикових ванночках, що входять до складу набору, безпосередньо перед використанням! Збовтати вміст флаконів з РК № 1 та РК № 2.

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

В іншу ванночку відібрати необхідну кількість (див. таблицю 1) РК № 2, додати відповідну кількість концентрату кон'югату № 2, ретельно перемішати піпетуванням.

### 8.3. Розчин ТМБ в робочому розведенні

Увага! Розчин ТМБ в робочому розведенні готувати в пластиковій ванночці, що додається до набору, безпосередньо перед використанням! Рекомендуємо виділити наконечники для піпеток, які використовувати лише для роботи з ТМБ.

Відповідно до числа використовуваних стріпів (див. таблицю 1), у ванночку для реагентів відібрати необхідну кількість концентрату ТМБ, додати відповідну кількість СБР, ретельно перемішати піпетуванням.

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

## ВИТРАТА КОМПОНЕНТІВ

Таблиця 1

	Кількість використовуваних стріпів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Промиваючий розчин</b>												
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
<b>Розчин кон'югату № 1</b>												
Кон'югат № 1 (концентрат), мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
РК № 1, 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
<b>Розчин кон'югату № 2</b>												
Кон'югат № 2 (концентрат), мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
РК № 2, 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
<b>Розчин ТМБ в робочому розведенні</b>												
ТМБ (концентрат), мкл	70	140	210	280	350	420	490	560	620	700	770	840
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

## 9. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

### 9.1. Проведення імуноферментного аналізу з метою виявлення р24-антігену ВІЛ-1

9.1.1. Підготувати необхідну кількість стріпів до роботи. Що залишилися – відразу упакувати щоб уникнути згубної дії вологи. Для цього стріпи помістити в цефлонний пакет з вологопоглиначем, ретельно закрити пакет пластиковою застібкою. Упаковані таким чином стріпи зберігати при температурі від 2 до 8°С до кінця терміну придатності.

*Приготувати промиваючий розчин (п. 8.1).*

9.1.2. В усі лунки стріпів внести по 50 мкл РРЗ. Потім в 2 лунки внести по 150 мкл К-, в 1 лунку – 150 мкл К+, в інші лунки – по 150 мкл досліджуваних зразків.

Увага! При внесенні досліджуваних зразків колір вмісту лунок змінюється на синій.

Стріпи закрити плівкою та інкубувати в термошейкері при 37°С **60 хв.**

Оптимальний режим для шейкера орбітального типу – 600-700 об/хв. (Pst-60, «Biosan», Латвія; St4, «Elmi», Латвія або аналогічний).

За 5-10 хвилин до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні (п. 8.2).

9.1.3. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємність з дезінфікуючим розчином, промити лунки стріпів 5 разів промиваючим розчином.

**Увага!** Кожну лунку при промиванні необхідно заповнювати повністю (вносити 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 папері. Не допускати висихання лунок планшетів між окремими операціями при постановці реакції.

9.1.4. В усі лунки стрипів внести по **100 мкл розчину кон'югату № 1** в робочому розведенні.

Стрипи закрити плівкою та інкубувати в термошейкері при 37°C **30 хв.**

За 5-10 хвилин до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату № 2 в робочому розведенні (п. 8.2).

9.1.5. По закінченню інкубації стрипи промити 5 разів, як описано в п. 9.1.3.

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

Стрипи закрити плівкою та інкубувати в термошейкері при 37°C **60 хв.**

9.1.7. Після закінчення інкубації стрипи промити 5 разів, як описано в п. 9.1.3.

9.1.8. Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 8.3).

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

**Увага!** Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку та одноразові наконечники, що входять до складу набору. Стрипи утримувати в захищеному від прямого сонячного світла місці при температурі від 18 до 25°C **30 хв.**

9.1.9. Зупинити реакцію додаванням в усі лунки по **100 мкл стоп-реагенту** і через 2-3 хвилини виміряти оптичну густину. Слід уникати потрапляння стоп-реагенту на одяг і відкриті ділянки тіла. При потраплянні – промити великою кількістю води.

## **9.2. Реєстрація та оцінка результатів виявлення р24-антигену ВІЛ-1**

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

9.2.2. Результати досліджень враховувати лише при дотриманні наступних умов:

- середнє значення ОГ в лунках з негативним контрольним зразком (ОГ<sub>серК-</sub>) не перевищує 0,15;
- значення ОГ в лунці з позитивним контрольним зразком – не менше 1,0.

9.2.3. Для досліджуваного зразка результат аналізу вважати позитивним, якщо значення ОГ у відповідній лунці рівно або перевищує критичне значення (ОГ<sub>крит</sub>), яке обчислити за формулою:

$$\text{ОГ}_{\text{крит}} = \text{ОГ}_{\text{серК}^-} + 0,07.$$

9.2.4. Зразки з позитивним результатом аналізу необхідно додатково досліджувати в підтверджуючому тесті (п. 9.3).

## **9.3. Проведення імуноферментного аналізу з метою підтвердження наявності р24-антигену ВІЛ-1 (підтверджуючий тест).**

**Увага!** Необхідна кількість сироватки (плазми) для одного аналізу в підтверджуючому тесті – 300 мкл.

9.3.1. Підготувати необхідну кількість стрипів до роботи. Мінімальна кількість використовуваних стрипів – 2. Один стрип використовується для проведення прямого ІФА, другий – для проведення конкурентного ІФА. На двох стрипах можна проаналізувати до 5 досліджуваних зразків (по 3 лунки кожного стрипу використовуються для постановки контролів).

Приготувати промиваючий розчин (п. 8.1).

9.3.2. В усі лунки стрипу для прямого ІФА внести по **50 мкл РРЗ**, а в усі лунки стрипу для конкурентного ІФА – по **50 мкл РПА**.

Потім внести до лунок стрипів для прямого і конкурентного ІФА по **150 мкл контрольних та досліджуваних зразків сироваток**. Наприклад, в лунки А1 та А 2, В1 та В2 внести по **150 мкл К-**, в лунки С1 та С2 – по **150 мкл К+**, в лунки D1 та D2 – по 150 мкл 1-го досліджуваного зразка, в лунки Е1 та Е2 – по **150 мкл 2-го досліджуваного зразка** і т.д.

**Увага!** При внесенні досліджуваних зразків до лунок стрипів для прямого ІФА колір вмісту лунок міняється на синій.

Стрипи закрити плівкою та інкубувати в термошейкері при 37°C **60 хв.** Оптимальний режим для шейкера орбітального типу – 600-700 об/хв.

За 5-10 хвилин до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні (п. 8.2).

9.3.3. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємність з дезінфікуючим розчином, промити лунки стрипів 5 разів промиваючим розчином.

**Увага!** Кожну лунку при промиванні необхідно заповнювати повністю (вносити 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 папері.

9.3.4. В усі лунки стрипів внести по **100 мкл розчину кон'югату № 1** в робочому розведенні.

Стрипи закрити плівкою та інкубувати в термошейкері при 37°C **30 хв.**

За 5-10 хвилин до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату № 2 в робочому розведенні (п. 8.2).

9.3.5. Після закінчення інкубації лунки стрипів промити 5 разів, як описано в п.9.3.3.

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

Стрипи закрити плівкою та інкубувати в термошейкері при 37°C **60 хв.**

9.3.7. Після закінчення інкубації лунки стрипів промити 5 разів, як описано в п. 9.3.3.

9.3.8. Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 8.3).

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

**Увага!** Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку й одноразові наконечники для піпетки, що входять до складу набору.

Стрипи витримати в захищеному від прямого сонячного світла місці при температурі від 18 до 25°C **30 хв.**

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

Слід уникати потрапляння стоп-реагенту на одяг і відкриті ділянки тіла. При потраплянні – промити великою кількістю води.

#### 9.4. Реєстрація та оцінка результатів підтвердження наявності р24-антигену ВІЛ-1

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

9.4.2. Результати досліджень враховувати лише при дотриманні наступних умов:

– середні значення ОГ в лунках з негативним контрольним зразком (ОГ<sub>ср К-</sub>) в прямому і в конкурентному ІФА не перевищують 0,15;

– значення ОГ в лунці з позитивним контрольним зразком (ОГ К+) **в прямому ІФА** – не менше 1,0; – значення ОГ в лунці з позитивним контрольним зразком (ОГ К+) **в конкурентному ІФА** знижується не менше, ніж на 50% в порівнянні з ОГ К+ в прямому ІФА, тобто спостерігається специфічне подавлення сигналу для позитивного контролю.

9.4.3. Для оцінки результатів аналізу досліджуваних зразків обчислити ОГ<sub>крит</sub>:

$$\text{ОГ}_{\text{крит}} = \frac{\text{ОГ}_{\text{ср К- прям.ІФА}} + \text{ОГ}_{\text{ср К- конкур.ІФА}}}{2} + 0,07$$

9.4.4. Визначити значення ОГ для кожної сироватки, отримані в прямому і конкурентному ІФА. Для кожного досліджуваного зразка з ОГ в прямому ІФА, що перевищує або рівною ОГ<sub>крит</sub>, обчислити % подавлення сигналу в конкурентному ІФА по формулі:

$$\% \text{ подавлення} = \frac{\text{ОГ}_{\text{прям.ІФА}} - \text{ОГ}_{\text{конкур.ІФА}}}{\text{ОГ}_{\text{прям.ІФА}}} \times 100\%$$

9.4.5. Результат дослідження зразка вважати позитивним, а зразок – р24-антиген, що містить, якщо ОГ<sub>обр</sub> в прямому ІФА перевищує або рівне ОГ<sub>крит</sub> і % подавлення не менше 50%.

9.4.6. Якщо ОГ<sub>обр</sub> > 2,0, а % подавлення < 50%, то необхідно повторити аналіз з розведеним в 10 разів зразком. Для розведення необхідно використовувати негативний контрольний зразок (К-). Якщо після розведення в 10 разів показник % подавлення стає вищим або рівний 50%, то результат визнають позитивним; якщо % подавлення залишається нижчим 50% – негативним (хибнопозитивним).

9.4.7. У сумнівних випадках, коли ОГ<sub>крит</sub> < ОГ<sub>обр</sub> < 2 Ч ОГ<sub>крит</sub>, а % подавлення < 50%, необхідно досліджувати даний зразок повторно в підтвердуючому тесті. У разі відтворення результату зразок вважати негативним, що не містить р24-антиген.

## 10. 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 – 14 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](mailto:info@bestdiagnostic.com.ua)

Виробник залишає за собою право у разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції та комплектації.