

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення сумарних антитіл до ВІЛ-1,2
«Анти-ВІЛ-1+2-БЕСТ»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для виявлення сумарних антитіл класів IgA, IgM, IgG до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 у сироватці або плазмі крові людини. Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, (комплект 3) – 480 аналізів включаючи контролю. Всі набори стрипової комплектації. Набір адаптований для постановки ІФА на аналітичних аналізаторах відкритого типу («MULTISCAN», виробник «Labsystems», «TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD» тощо).

СКЛАД ТА КОМПЛЕКТАЦІЯ НАБОРУ (З РОЗРАХУНКУ НА 1 ПЛАНШЕТ)

- **планшет-імуносорбент** з іммобілізованими синтетичними антигенами ВІЛ-1,2 – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок інактивованій (**К+**), що містить антитіла до ВІЛ-1,0 та ВІЛ-2; прозора рідина червоного кольору – 1 фл.;
- контрольний негативний зразок (**К-**): інактивованій; прозора рідина світло-жовтого кольору – 1 фл.;
- **кон'югат 1**: (мічені біотином синтетичні білки ВІЛ-1,0 та ВІЛ-2; прозора рідина синього кольору) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату-1 (**РРК-1**): прозора або злегка опалесцентна, безбарвна рідина, допускається виникнення осаду, що розбивається при струшуванні – 1 фл.;
- кон'югат 2: (стрептавидін, кон'югований з пероксидазою хрому; прозора або злегка опалесцентна, безбарвна рідина) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату-2 (**РРК-2**): прозора рідина червоного кольору – 1 фл.;
- 25-кратний концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25): злегка опалесцентна рідина, можливе випадіння осаду білого кольору, що розчиняється при температурі 72 С на протязі 30 хвилин – 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР): прозора безбарвна рідина – 1 фл.;
- хромоген (ГМБ): розчин тетраметілбензидіну; прозора безбарвна чи рожевого кольору рідина – 1 фл.;
- стоп-реагент: прозора безбарвна рідина – 1 фл.;
- набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

ПРИНЦИП ДІЇ

При наявності в досліджуваному зразку антитіл до ВІЛ-1,0 та/або ВІЛ-2 вони зв'язуються з антигенами імуносорбента, комплекси що утворюються зв'язуються з кон'югатом-1 (мічені біотином синтетичні білки ВІЛ-1,0 та ВІЛ-2), потім з кон'югатом-2 (стрептавидін, кон'югований з пероксидазою хрому) та виявляються потім в реакції з субстратно-індикаторним розчином, що містить хромоген — тетраметілбензидин, в результаті якої змінюється колір (оптичної густини) реакційної суміші в лунці планшету; зміна реєструється спектрофотометрично.

АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діагностична чутливість при досліджуванні зразків з підтверджуючим діагнозом ВІЛ-інфекції - 100%.

Діагностична специфічність при досліджуванні зразків крові донорів — 100%.

ДОСЛІДЖУВАЛЬНІ ЗРАЗКИ

Сироватка (плазма) крові людини об'ємом не менше 50 мкл.

Зразки до дослідження можна зберігати не більше 7 діб при температурі від 2 до 8 С або до 3 міс. при температурі мінус 20 С або нижчою. Допускається тільки одноразове заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки перед дослідженням ретельно перемішати.

Зразки, що містять осад, перед аналізом відцентрифугувати протягом 10-15 хв. при 2500-3000 об /хв.

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.

СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ, "РУЧНА" ПОСТАНОВКА

Приготування робочих розчинів 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.

Приготування робочого розчину для промивання (ФСБ-Т)

При випаданні осаду солей в ФСБ-Т (x25) прогріти його при температурі 37 С до повного розчину осаду.

Для приготування використовувати співвідношення об'ємів ФСБ-Т (x25) та води, зазначені в табл. 1

Таблиця 1

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(x25), мл	5	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищена, мл	до 125	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовий робочий промиваючий розчин зберігати при температурі від 2 до 8 °С не більше 14 діб.

Приготування робочого розчину кон'югату-1.

Готувати не менше ніж за 10 хв. до використання.

Для приготування використовувати співвідношення об'ємів кон'югату-1 та РРК-1, зазначені в табл. 2

Таблиця 2

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
РРК-1, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,5
Кон'югат-1, мкл	35	70	105	140	175	210	245	280	315	350	385	455

Примітка: Обсяги кон'югату-1 визначаються для кожної серії набору.

Робочий розчин кон'югату-1 допускається зберігати перед використанням не менше 3 год. при температурі від 18 до 25 С, розчин стабільний протягом 6 год. при температурі від 2 до 8 С.

Приготування робочого розчину кон'югату-2.

Готувати не менше ніж за 10 хв. до використання.

Для приготування використовувати співвідношення об'ємів кон'югату-2 та РРК-2, зазначені в табл. 3

Таблиця 3

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
РРК-2, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Кон'югат-2, мкл	35	70	105	140	175	210	245	280	315	350	385	455

Примітка: Обсяги кон'югату-2, визначаються для кожної серії набору.

Робочий розчин кон'югату-2 допускається зберігати перед використанням не менше 3 год. при температурі від 18 до 25 С, розчин стабільний протягом 6 год. при температурі від 2 до 8 С.

Приготування субстратно-індикаторного розчину (при роздільній комплектації СБР та ТМБ)

Готувати перед використанням в місці, захищеному від впливу прямого сонячного світла. В допоміжну пластикову ємкість внести спочатку СБР, після ТМБ, ретельно перемішати отриманий розчин.

Для приготування використати співвідношення об'ємів СБР та ТМБ, зазначених в табл. 4 для різного числа стрипів.

Таблиця 4

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ, мкл	80	160	240	320	400	480	560	640	720	800	880	1040

Субстратно-індикаторний розчин допускається зберігати перед використанням стабільний не менше 3 год. при температурі від 18 до 25 С в захищеному від світла місці, розчин стабільний протягом 6 год. при температурі від 2 до 8 С.

Приготування інших реагентів

К⁻, К^{+AT}, СБР-ТМБ (при комплектації готовим субстратним розчином з тетраметил-бензидином), стоп-реагент - готові до вживання.

Не використані реагенти зберігати у щільно закритих флаконах при температурі від 2 до 8 С до збігання терміну придатності.

Проведення ІФА

Увага! Дотримання вказаних нижче температури і часу інкубації планшетів на кожній стадії постановки вкрай важливо для отримання достовірних результатів.

1. Видалити рамку планшету з необхідним числом стрипів. Невикористані стрипи з відкритого пакету зберігати у щільно закритому пакеті з волопоглиначем при температурі від 2 до 8 С.

Планшет одноразово промити робочим розчином для промивання, вносячи в лунки 350-370 мкл. розчину. При наявності промивача, що дозволяє виробляти промивку в режимі "Overflow", використовувати цей режим. Після закінчення промивання видалити залишки вологи з лунок, постукуючи планшетом по складеному в декілька шарів фільтрувального паперу.

2. В усі лунки внести по 50 мкл робочого розчину кон'югату-1.

В дві лунки (напр., А1, В1) внести по 50 мкл К⁺, в дві лунки (напр., С1, D1) - по 50 мкл К⁻; в інші лунки — по 50 мкл досліджувальних зразків, перемішуючи розчин в лунках піпетуванням. На даному етапі спостерігається кольорова індикація.

3. Закрити планшет клейкою плівкою та інкубувати 30 хв. при температурі 37 С в захищеному від світла місці.

4. За допомогою промивача видалити зразки з лунок, 6 разів промити планшет промиваючим розчином, як в п.1.

5. У всі лунки внести по 100 мкл робочого розчину кон'югату-2.

6. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою і інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37 С в захищеному від світла місці.

7. За допомогою промивача видалити рідину з лунок, 6 разів промити планшет, як зазначено в п. 1.

8. В усі лунки внести по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину, планшет накрити кришкою або заклеїти плівкою, негайно помістити в захищене від світла місце та витримати 15 хв. при температурі 37 С.

9. У всі лунки (у тій же послідовності, з якою вносився субстратно-індикаторний розчин) внести по 100 мкл стоп-реагенту, обережно (постукуванням по планшету) перемішати вміст лунок і через 5 хв., но не пізніше ніж через 20 хв. приступити до реєстрації результатів.

Реєстрація та облік результатів

Результати ІФА реєструвати спектрофотометрично, вимірюючи оптичну густину (ОГ) при довжині хвилі 450 нм (допустимо використання фільтра порівняння з довжиною хвилі 620 або 650 нм). Нульовий рівень ("бланк") здійснювати по повітрю.

Облік результатів дослідження проводити тільки при наступних умовах:

середнє значення ОГ в лунках з К- (ОГ К-сер) - не більше 0,2;

значення ОГ в лунках з К+ (ОГ К+сер) - не менш 1,0.

Розрахувати ОГ_{крит} за формулою:

$ОГ_{крит} = ОГ \text{ К-сер} + A$, де $A = 0,200$ (вказується у паспорті для кожної серії набору).

Досліджувану сироватку оцінювати як позитивну, тобто, що містить антитіла до ВІЛ-1,О, та/або до ВІЛ-2, якщо ОГ досліджуваної сироватки дорівнює чи перевищує ОГ_{крит}.

Досліджувану сироватку оцінювати як негативну, якщо значення ОГ сироватки нижче ОГ_{крит}.

Значення ОГ досліджуваних сироваток зі знаком "-" при аналізі вважати рівним нулю.

ПОСТАНОВКА З ВИКОРИСТАННЯМ ІФА-АНАЛІЗАТОРІВ

Приготувати прилад у відповідності до інструкції з використання, вести програму аналізу, відповідну використуваному набору та провести аналіз.

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.

По питаннях, що стосуються якості набору, звертатися

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 інструкцій

Зведена таблиця приготування робочих розведень реагентів при дрібних постановках

Число стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Робочий промиваючий розчин (ФСБ-Т)												
ФСБ-Т(х25), мл	5	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищена, мл	до 125	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000
Робочий розчин кон'югату-1												
РРК-1, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,5
Кон'югат-1, мкл	35	70	105	140	175	210	245	280	315	350	385	455
Робочий розчин кон'югату-2												
РРК-2, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Кон'югату-2	35	70	105	140	175	210	245	280	315	350	385	455
Субстратно-індикаторний розчин												
СБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ, мл	80	160	240	320	400	480	560	640	720	800	880	1040

Примітка: об'єми кон'югату-1 та кон'югату-2 вказуються для кожної серії набору.

КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ ІФА
(«Анти-ВІЛ-1+2-БЕСТ»)

Промити	1 раз промиваючим розчином
Внести	В усі лунки планшету - по 50 мкл робочого розчину кон'югату-1. У дві лунки - по 50 мкл К +, в дві лунки - по 50 мкл К-. В інші лунки — по 50 мкл досліджуван- них зразків
Інкубація	30 хв., 37 °С
Промити	6 разів промиваючим розчином
Внести	по 100 мкл робочого розчину кон'югата-2 в кожную лунку
Інкубація	30 хв., 37 °С
Промити	6 разів промиваючим розчином
Внести	по 100 мкл субстратно-індикаторного розчину в кожную лунку
Інкубація	15 хв., 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагенту в кожную лунку
Виміряти	ОГ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по повітрю