

### **ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ**

Набір реагентів для імуноферментного виявлення антитіл до ВІЛ-1,2  
**«HIV-1/2»**

#### **1. ПРИЗНАЧЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Набір реагентів «HIV-1/2 - Бест» призначений для визначення антитіл до ВІЛ-1 (gp120, gp41, p24) subtype O та ВІЛ-2 (gp36) в сироватці або плазмі крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи.

- Діагностична специфічність набору «**HIV-1/2**» становить 100%.
- Діагностична чутливість набору «**HIV-1/2**» становить 100%.

#### **2. СКЛАД НАБОРУ (З РОЗРАХУНКУ НА 1 ПЛАНШЕТ)**

- **планшет-імуносорбент** з іммобілізованими синтетичними пептидами ВІЛ-1, ВІЛ-2 – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (**K+**) – 1 фл. або 2 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (**K-**) – 1 фл. або 2 фл.;
- **кон'югат** (білки кон'юговані з пероксидазою хрину до антитіл людини IgG) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для попереднього розведення (**РПР**) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (**РРК**) – 1 фл. або 2 фл.;
- розчин для розведення сироватки (**РРС**) - 1 фл. або 2 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (**ФСБ-Тх25**) – 1 фл. або 2 фл.;
- субстратний буферний розчин (**СБР**) – 1 фл. або 2 фл.;
- тетраметілбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл. або 2 фл.;
- **стоп-реагент** – 1 фл. або 2 фл.;
- набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

#### **3. СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ ТА 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

***УВАГА! Ретельне дотримання описаних нижче вимог дозволить уникнути спотворення результатів ІФА.***

- Для приготування розчинів і проведення ІФА слід використовувати чистий мірний посуд і автоматичні піпетки з погрішністю виміру об'ємів не більше 5%.
- Бажано використовувати свіжовідібрані зразки сироватки (плазми) крові. Допускається використання зразків, що зберігалися при (2-8)°C не більше 5 діб, або при мінус (20±3)°C, якщо необхідне триваліше зберігання.
- Сироватки, що містять зважені частки, можуть дати неправильний результат. Такі зразки перед використанням слід центрифугувати 10-15 хв. при 3000 об/хв.
- Не можна використовувати пророслі, гемолізовані, гіперліпідні сироватки або які не раз було заморожено та розморожено.
- Перед постановкою реакції всі компоненти набору необхідно витримати при температурі від 18 до 25°C не менше 30 хв.
- Ліофілізовані компоненти мають бути відновлені, як мінімум, за 15 хвилин до їх використання.
- Відразу після постановки реакції невикористаний планшет і щільно закриті флакони з вихідними компонентами необхідно помістити в холодильник (2-8)°C.
- Розчини ТМБ і кон'югату в робочому розведенні готувати безпосередньо перед використанням. Необхідно виключити дію прямого світла на розчин ТМБ .

- При промиванні лунки (стрипа, планшета) заповнювати повністю, не допускаючи переливання промиваючого розчину через краї лунок, не торкаючись лунок наконечником дозатора. Час між заповненням і спороженням лунок має бути не менше 30 сек.
- При використанні автоматичного або ручного промивача необхідно стежити за станом ємкості для промивального розчину і сполучних шлангів: у них не повинно бути «заростів». Раз на тиждень бажано ємкість для промивального розчину і шланги промивати 70% спиртом.
- Не допускати висихання лунок планшета між окремими операціями.
- При постановці ІФА не можна використовувати компоненти з наборів різних серій або змішувати їх при приготуванні розчинів, окрім неспецифічних компонентів (ФСБ-Тх25, СБР, концентрат ТМБ, стоп-реагент), які взаємозамінні у всіх наборах ТОВ «Бест Діагностик»
- Забороняється повторне використання планшета для попереднього нанесення сироваток.
- При приготуванні розчинів і проведенні ІФА слід використовувати **одноразові** наконечники для дозаторів.
- Посуд (*ванночки*), який застосовується для роботи з розчинами кон'югату й ТМБ, не обробляти дезінфікуючими розчинами і миючими засобами.
- В разі повторного використання посуду (*ванночки*) для розчину кон'югату промити проточною водою й ретельно ополоснути дистильованою водою; посуд (*ванночки*) для розчину ТМБ відразу після роботи промити 50% розчином етилового спирту, а потім дистильованою водою.
- Для дезінфекції посуду та матеріалів, що контактують з досліджуваними й контрольними зразками, рекомендуємо використовувати дезінфікуючі засоби, що не надають негативної дії на якість ІФА, які не містять активний кисень і хлор, наприклад, комбіновані засоби на основі ЧАЗ (*четвертинних амонієвих з'єднань*), спиртів, третинних амінів.
- Піпетки та робочі поверхні обробляти лише 70% розчином етилового спирту. Не використовувати під час проведення ІФА перекис водню, хлорамін і т.д.

### 3.1. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

#### 3.1.1. Промиваючий розчин

Збовтати вміст флакону з ФСБ-Тх25. При випаданні в концентраті осаду солей прогріти його до повного розчинення осаду.

Відповідно до числа використовуваних стрипів відібрати необхідну кількість ФСБ-Тх25 (див. таблицю,) й розвести його дистильованою водою, до вказаного в таблиці об'єму або вміст одного флакона – до 700 мл.

*Зберігання: при (2-8)°C до 72 год.*

#### 3.1.2. Розчини кон'югатів

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

Приготувати концентрований розчин кон'югату шляхом розчинення вмісту флакона з кон'югатом в 1 мл РПР.

**Зберігання:** концентрований розчин кон'югату – при (2-8)°C до 2 тижнів, при мінус 20°С – протягом 2-х місяців. Допускається 5-кратне заморожування.

**Увага!** Розчин кон'югату в робочому розведенні готувати в пластиковій баночці, що входить до складу набору, безпосередньо перед використанням!

Ретельно збовтати вміст флакона з розчином для розведення кон'югату (РК).

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югату, додати відповідну кількість РРК (див. таблицю), ретельно перемішати піпетуванням. Розчин кон'югату в робочому розведенні зберігання не підлягає.

#### 3.1.3. Розчин ТМБ в робочому розведенні

**Увага!** Розчин ТМБ в робочому розведенні готувати в пластиковій ванночці, що входить до складу набору, безпосередньо перед використанням!

Рекомендуємо виділити наконечники для піпеток, які використовувати лише для роботи з ТМБ.

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрату ТМБ (див. таблицю), додати до неї відповідну кількість СБР, ретельно перемішати.

**Увага!** Допустиме блакитне фарбування розчину ТМБ в робочому розведенні, яке не робить впливу на результати аналізу.

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

Таблиця витрат реагентів

	Кількість використовуваних стрипів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Промиваючий розчин</b>												
ФСБ-Т 25, 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 в робочому розчині</b>												
Кон'югат у (концентрат), мкл	□*	2	□ 3	□ 4	□ 5	□ 6	□ 7	□ 8	9	□ 10	□ 11	□ 12
РРК, 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 розчині</b>												
ТМБ (концентрат), мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
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

□□□□▲▲▲ мкл

### 3.2. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Підготувати необхідну кількість стрипів до роботи. Що залишилися – відразу упакувати, щоб уникнути згубної дії вологу. Для цього стрипи помістити в цефлонний пакет з вологопоглиначем, ретельно закрити пакет пластиковою застібкою. Упаковані таким чином стрипи зберігати при (2-8)°C протягом терміну придатності.

Приготувати промиваючий розчин (п. 3.1.1), контрольні зразки (п. 3.1.2).

В усі лунки внести по 30 мкл розчину для розведення сироваток (РС).

У 1 лунку стрипу внести 70 мкл К+, в 2 лунки – по 70 мкл К-, в останні лунки – по 70 мкл цільних тестованих сироваток.

**Увага!** Сироватки і контрольні зразки вносити до лунок акуратно, уникаючи розбризкування.

Лунки заклеїти плівкою та інкубувати при 37°C 1 годину.

За 1-2 хв. до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату в робочому розведенні (п. 3.1.2).

Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємкість з дезінфікуючим розчином, промити лунки планшета 7 разів промиваючим розчином.

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

У всі лунки внести по 100 мкл розчину ТМБ в робочому розведенні.

**Увага!** Для внесення розчину ТМБ в робочому розведенні використовувати пластикову ванну і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

Лунки заклеїти плівкою та інкубувати при 37°C 30 хв.

- Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в ємкість з дезінфікуючим розчином, промити лунки 7 разів промивальним розчином і видалити вологу з лунок як описано вище.

- Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 3.1.3). У всі лунки внести по 100 мкл розчину ТМБ.

**Увага!** Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванну і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

Планшет помістити в захищене від світла місце при (18 - 25)°C на 30 хв.

- Зупинити реакцію додаванням в усі лунки по 100 мкл стоп-реагента і через 2-3 хвилини виміряти оптичну густину (ОГ).

#### 4. РЕЄСТРАЦІЯ ТА ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

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

Результати досліджень враховувати лише при дотриманні наступних умов:

- середнє значення ОГ в лунках з негативним контрольним зразком (ОГсер К-) не більше 0,25;
- середнє значення ОГ в лунках з позитивними контрольними зразками (ОГсер К+) не менше 0,8.

Досліджувану сироватку розцінювати як позитивну, якщо відповідне нею значення ОГ перевищує або рівне ОГкрит, яку розрахувати по формулі:

$$\text{ОГ}_{\text{крит}} = \text{ОГ}_{\text{сер К}^-} + 0,15.$$

#### 5. 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.

*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