

### ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

#### Тест-система імуноферментна для виявлення та підтвердження антитіл до окремих білків ВІЛ-1 методом імунного блотингу «ВІЛ-1-БЛОТ-БЕСТ»

##### Призначення

Виявлення антитіл до окремих білків ВІЛ-1 в сироватці (плазмі) крові людини методом імунного блотингу (формат "Вестерн-Блот") – тест, підтверджуючий виявлення антитіл до ВІЛ-1.

##### СКЛАД ТА КОМПЛЕКТАЦІЯ НАБОРУ

Імуносорбент	полоски (стрипи) з нітроцелюлозної мембрани з сорбованими на них методом електропереносу окремих білків (антигенів) ВІЛ-1: gp160, p110/120, p68/66, p55, p52/51, gp41, p40, p34/31, p24/25, 18/17	18 (24) стрипів
Контрольний позитивний зразок (K <sup>+</sup> )	інактивований; прозора рідина світло-жовтого кольору	1 фл.
Контрольний негативний зразок (K <sup>-</sup> )	інактивований; прозора рідина світло-жовтого кольору	1 фл.
Кон'югант	антитіла проти імуноглобулінів G людини, кон'юговані з лужною фосфатазою; прозора безбарвна рідина (розчин або концентрат)	1 фл.
Забарвлювальний розчин	5-бром-4-хлор-3-індолілфосфат та нітроголубий тетразолій; прозора світло-зеленого кольору рідина	1 фл.
5-кратний концентрат промивального розчину [ПР(x5)]	прозора безбарвна піноутворююча рідина	2 фл.
Розчин для розведення сироваток та кон'югата(РРСК)	непрозора піноутворююча рідина світло-жовтого кольору	2 фл.
Референс-стрип (або його фотографія)	стрип з проявленим білковим профілем антигену ВІЛ-1	1 шт.

*Набір включає всі реагенти, необхідні для проведення ІФА, окрім очищеної (дистильованої або деіонізованої) води. Можливе використання неспецифічних реагентів (забарвлюючий розчин, ПР(x5)) різних серій набору.*

Набір додатково може бути укомплектовано 3 (4)-ма ванночками пластмасовими з лунками для проведення реакції (на 6 стрипів кожна), пінцетом пластиковим. По бажанню споживача базова комплектація набору (кількість індивідуальних упаковок з реагентами та їх об'єм) може бути змінена, стрипи внесені до лунок.

##### ОСНОВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовий варіант комплектації набору дозволяє одночасно дослідити 18 (24) зразків, включаючи контролю (на контрольні зразки використовується 2 стрипа). Передбачено проведення роздільних досліджень з використанням необхідної кількості стрипів. В даному випадку допускається дослідження контрольних зразків тільки в першій постановці після розкриття набору.

##### ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

В основі тесту лежить метод непрямого імуноферментного аналізу на нітроцелюлозній мембрані, на яку методом електропереносу нанесено основні індивідуальні білки ВІЛ-1, отримані при електрофоретичному розділенні антигену ВІЛ-1. Антитіла до ВІЛ-1 (при їх вмісті в досліджуваному зразку) зв'язуються з індивідуальними білками ВІЛ-1, сорбованими на стрипі. Отримані комплекси потім зв'язуються кон'югантом, ферментативна активність котрого приводить до з'явлення забарвлених смужок на стрипах в зонах локалізації відповідних індивідуальних білків ВІЛ-1.

## АНАЛІТИЧНІ ТА ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діагностична чутливість набору – 100 %.

Діагностична специфічність – 100 %..

### ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Тест треба проводити з цільною сироваткою або плазмою крові людини, в котрій по результатам попереднього скрінінгового дослідження виявлено антитіла к ВІЛ-1.

Зразки сироватки (плазми) зберігають при температурі від 2 до 8 °С не більше 7 діб; для більш довготривалого зберігання зразки потрібно зберігати при температурі мінус 20 °С.

Допускається двократне замороження-відтаювання досліджуваних зразків. Після розмороження зразки сироватки (плазми) крові потрібно відцентрифугувати 3000 об/хв протягом 10-15 хв.

Дослідження гемолізованих зразків, з бактеріальним проростанням, а також тривалого зберігання без замороження, не допускається!

Якщо зразки необхідно транспортувати, вони повинні бути упаковані за правилами транспортування інфекційного матеріалу.

### ЗАСОБИ БЕЗПЕКИ

Набір біологічно безпечний, але досліджувані зразки треба вважати як потенційно інфіковані.

### СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

Якість отриманих результатів залежить від точного виконання наступних правил:

- перед використанням набір реагентів потрібно витримати при кімнатній температурі (від 18 до 25 °С) не менше 30 хв;
- при роботі зі стрипами користуватися гумовими рукавичками та пластмасовим пінцетом; при дотику пальців можуть залишатися плями.

### Обладнання та матеріали

- Вода очищена (дистильована або деіонізована)
- Градуйовані циліндри на 50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл.
- Автоматичні та напівавтоматичні піпетки зі змінним або постійним об'ємом.
- Наконечники одноразові на 0,5-250 мкл і 1-5 мл.
- Шейкер орбітальний (20-60 коливань в хвилину).
- Одноразові рукавички.
- Вакуумний насос для відсмоктування рідини з герметичної ємкості для відходів.
- 6% розчин перекису водню.
- Фільтрувальний папір.
- Пластмасовий пінцет.

### Підготовка робочих розчинів.

Імуносорбент, K<sup>+</sup>, K<sup>-</sup>, забарвлюваний розчин, РРСК готові до застосування.

#### Приготування робочого промивального розчину

РР(х5) розвезти очищеною водою; використовуючи співвідношення компонентів, які вказані в табл..1

Таблиця 1

Компонент	Ед. изм.	Кількість компонентів при використанні .... стрипів			
		6	12	18	24
РР(х5)	мл	20	40	60	80
Вода очищена	мл	80	160	240	320

Робочий промивний розчин стабільний при температурі від 2 до 8 °С протягом 1 міс.

#### Приготування робочого розведення кон'югату

Приготуйте робоче розведення кон'югату використовуючи співвідношення компонентів, які вказані в табл..2.

Таблиця 2

Компонент	Ед. изм.	Кількість компонентів при використанні .... стрипів			
		6	12	18	24
Кон'югат	мл	0,3	0,6	0,9	1,2
РРСК	мл	15	30	45	60

### Проведення аналізу методом імунного блотингу

1. Відкрити упаковку зі стрипами. Обережно, пластмасовим пінцетом, перекласти стрипи маркірованою стороною вгору в лунки ванночок для проведення імунного блотингу, щоб стрипи з нанесеними вірусними білками були покриті розчинами реагентів протягом всього дослідження. Лунки ванночок промаркувати у відповідності з номерами досліджуваних зразків.
2. Внести в кожну лунку ванночки по 2,0 мл РРСК та інкубувати 5 хв. при температурі від 18 до 25 °С, на шейкері при 20-40 об/хв.
3. Додати по 20 мкл кожного з досліджуваних та контрольних (K<sup>+</sup> і K<sup>-</sup>) зразків у відповідно промарковані лунки. Інкубувати протягом 2 год. при температурі від 18 до 25 °С, на шейкері при 20-40 об/хв.
4. Після інкубації, використовуючи вакуумний насос, повністю видалити рідину з кожної лунки в ємність з дезінфікуючим розчином. Необхідно бути обережним, щоб при відсмоктуванні рідини з лунок не випав стрип. Наконечник

відсмоктувального пристрою після кожного контакту з різними зразками сироваток потрібно промити очищеною водою або використовувати для кожного зразка окремий одноразовий наконечник для уникнення перехресної контамінації.

5. Внести в кожну лунку по 2,0 мл робочого промивального розчину й промити стрипи протягом 5 хв. , на шейкері при 20-40 об/хв.. Промивку зробити 3 рази. Після останньої промивки розчин видалити з лунок.

6. Внести в кожну лунку по 2,0 мл робочого розведення кон'югату. Інкубувати протягом 1 год при температурі від 18 до 25 °С, на шейкері при 20-40 об/хв.

7. 3 рази промити кожний стрип, як вказано в п. 5.

**Увага!** Недостатня промивка на цьому етапі може призвести до появи на стрипі темного фону.

8. Внести в кожну лунку по 2,0 мл забарвленого розчину.

9. Інкубувати в захищеному від світла місті при температурі від 18 до 25 °С, на шейкері при 20-40 об/хв, до появи на стрипі, прореагувавших з  $K^+$ , чітко забарвлених смужок (5-10 хв).

10. Для зупинки реакції видалити з лунок забарвлений розчин і промити стрипи 3 рази очищеною водою, наливаючи в кожну лунку по 2,0 мл води.

11. Обережно, пінцетом, видалити стрипи з лунок ванночки. Висушити стрипи між двома листами фільтрувального паперу при кімнатній температурі. Розташувати їх маркірованою стороною доверху для оцінки результатів.

### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### Перелік індивідуальних білків, які входять до складу ВІЛ-1

Присутність в зразку сироватки (плазми) крові людини антитіл до білків ВІЛ-1 виявляється при появі забарвлених смужок. Їх розташування відповідає молекулярним масам білків, які вказано в табл.3.

Таблиця 3

Білок	Продукт гена	Опис	Візуальна характеристика забарвленої смужки на стрипі.
gp 160	ENV	Глікопротеїн, попередник gp110/120 та gp41	Чітка смуга темно-фіолетового кольору, іноді дифузна.
p110/120	ENV	Глікопротеїн оболонки	Смуга темно-фіолетового кольору з дифузними кордонами
p 68/66	POL	Зворотна транскриптаза	Чітка смуга темно-фіолетового кольору
p 55	GAG	Попередник білків нуклеокапсіда (core)	Чітка смуга темно-фіолетового кольору, іноді у вигляді подвійної лінії
p 52/51	POL	Протеаза	Чітка смуга темно-фіолетового кольору
gp 41	ENV	Трансмембранний глікопротеїн	Смуга темно-фіолетового кольору з дифузними кордонами
p 40	GAG	Попередник білків нуклеокапсіда	Чітка смуга темно-фіолетового кольору
p 34/31	POL	Ендонуклеаза	Чітка смуга темно-фіолетового кольору
p 24/25	GAG	Білок нуклеокапсіда	Чітка смуга темно-фіолетового кольору
p 18/17	GAG	Білок нуклеокапсіда	Смуга темно-фіолетового кольору, іноді у вигляді подвійної лінії

Облік результатів дослідження сироваток проводять при наступних умовах:

- На кожному стрипі повинна бути чітко забарвлена контрольна смуга – смуга контролю вірності проведення реакції.
- білковий профіль на стрипі з  $K^+$  відповідає референс-стрипу; присутність або відсутність смуги p18 не являється необхідною умовою для оцінки достовірності отриманих результатів.
- стрип з  $K^-$  не має забарвлених смуг.

В іншому разі дослідження необхідно повторити.

#### Інтерпретація результатів

Проводиться по критеріям, які розроблено ВООЗ (WHO), по критеріям Консорціуму зі стандартизації дослідження ретровірусів (CRSS):

Результат	Критерії WHO	Критерії CRSS
Позитивний	2 ENV $\pm$ GAG $\pm$ POL	1 ENV +(1GAG або 1POL)
Невизначений	1 ENV $\pm$ GAG $\pm$ POL GAG + POL GAG POL	GAG + POL або GAG або POL або ENV
Негативний	Відсутність смуг. Смуги, не відповідають білкам ВІЛ-1.	Відсутність смуг. Смуги, не відповідають білкам ВІЛ-1.

Невизначений результат може означати, що:

- в зразку містяться антитіла до ВІЛ-2;
- зразок отримано в період сероконверсії;
- спостерігається неспецифічна реакція, визнана наявністю антитіл до інших ретровірусів.

При проведенні вхідного контролю характеристика смуг на стрипах з сироватками, які містять антитіла до ВІЛ-1, має відповідати характеристикам, які вказано в паспорті на серію; на стрипах з сироватками, які не містять антитіла та антиген р24 ВІЛ-1, смуги повинні бути відсутніми. В виключних випадках на стрипах з сироватками можуть проявлятися слабозабарвлені неспецифічні смуги в області окремих білків р24, р17, р55, що вказано в паспорті на дану серію.

#### ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору 18 місяців.

#### ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Зберігання та транспортування при температурі від 2 до 8 °С. Допускається транспортування при температурі від 9 до 25 °С протягом 10 діб.

Замороження не допускається.

**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

#### КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ («ВІЛ-1-БЛОТ-БЕСТ»)

<b>Внести</b>	в лунки ванночок по одному стрипу для кожного контрольного та досліджуваного зразка; в кожен лунку – по 2 мл РРСК
<b>Інкубація</b>	5 хв, 18-25 °С, на шейкері (20-40 об/хв)
<b>Внести</b>	по 20 мкл контрольних та дослідних зразків
<b>Інкубація</b>	2 год, 18-25 °С, на шейкері (20-40 об/хв)
<b>Промити</b>	3 рази ПР
<b>Внести</b>	в кожен лунку по 2,0 мл робочого розведення кон'югату
<b>Інкубація</b>	1 год, 18-25 °С, на шейкері (20-40 об/хв)
<b>Промити</b>	3 рази ПР
<b>Внести</b>	в кожен лунку по 2,0 мл забарвлювального розчину
<b>Інкубація</b>	5-10хв., 18-25 °С, на шейкері (20-40 об/хв)
<b>Промити</b>	3 рази водою очищеною
Висушити стрипи між двома листами фільтрувального паперу та зареєструвати результати	