Набор для определения антител к ВИЧ (1+2) в сыворотке или плазме человека

Anti-HIV (1+2)

Каталог. № : E-HIV-1P
Количество : 96

Внимание: *основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.*

Методика от ***11-2005***

НАЗВАНИЕ и ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный ELISA набор – ферментный иммуноанализ для определения присутствующих антител к Вирусу Иммунодефицита Человека Типа 1 (HIV-1) или к Вирусу Иммунодефицита Человека Типа 2 (HIV-2) в человеческой сыворотке или плазме и предназначен как скрининговый анализ для сыворотки или плазмы и как вспомогательное вещество в диагностике потенциальной инфекции HIV-1 и/или HIV-2.

ОБОБЩЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Тип Вируса Иммунодефицита Человека (HIV-1) был изолирован от больных СПИДОМ и СПИД-относящимся комплексом (ARC). До 1986 HIV-1 считался самопровоцируемым агентом этих синдромов, когда второй тип Вируса Человеческого Иммунодефицита (HIV-2) был изолирован и также, считался таким, что вызывал СПИД. Начиная с первоначального открытия были зарегистрированы более чем 600 случаев HIV-2 инфекции во всем мире, с более чем 40 случаями СПИДА, связанного с HIV-2.

Оба вируса имеют ту же самую морфологию и лимфотропизм, и способы передачи оказываются идентичными. Кроме того, HIV-1 и HIV-2 геномы демонстрируют приблизительно 60 % гомологию в эволюционно стабильных генах типа *gag* (ген капсидных белков) и *pol* (полимерный ген). Серологические исследования также показали, что капсидные белки HIV-1 и HIV-2 часто демонстрируют перекрестную реактивность, в то время как оболочковые белки более специфичны для типа.

Несмотря на эту иммунологическую перекрестную реактивность, определение антител к HIV-2 любым из запатентованных HIV-1 ферментных иммунологических анализов очень отличается. Данный HIV-1/HIV-2 анализ был разработан для обнаружения антител к HIV-1 и/или HIV-2 в скрининге крови и в диагностических целях.

Любой образец, который реагирует в начальном анализе с HIV-1/HIV-2 ИФА, должен анализироваться повторно в дублете с HIV-1/HIV-2 ИФА. Повторно реактивные образцы могут содержать антитела или к HIV-1 или HIV-2. Поэтому, дополнительные, более специфичные или полные анализы на антитела и к HIV-1 и HIV-2, такие как иммуноблот, иммунофлуоресценция, радиоиммунопреципитация должны проводится для проверки наличия антител к ВИЧ.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА

HIV-1/HIV-2 ИФА использует систему обнаружение, где лунки микропланшета покрыты синтетическими пептидами и рекомбинантным антигеном, соответствующими высоко антигенному сегменту HIV-1/HIV-2 оболочки и капсидным белкам. Образцы сыворотки или плазмы, контроли вносятся в лунки. В течение инкубации, антитела, специфические для HIV-1 и HIV-2, которые присутствуют в образце связываются с пептидами и рекомбинантным антигеном, закрепленным на лунках микропланшета. Лунки промываются, чтобы удалить несвязанные вещества и конъюгат рекомбинантного антиген свяжется с комплексом антиген-антитело, и избыток несвязанных ферментных конъюгатов, снова будет удален промыванием. Ферментный субстрат, tetramethylbenzidine (TMB), добавляется во время инкубации, субстрат гидролизируется связанным ферментом и в лунках, содержащих HIV-1 и/или HIV-2 специфические антитела образуется синий или сине-зеленый цвет окрас. Ферментная реакция останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность образовавшегося цвета считывается спектрофотометрическим методом при 450нм и пропорциональна сумме антител, присутствующих в образце.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Покрытый микропланшет:** 1 планшет (96 тестов) 12 8-луночных полосок/планшет. Каждый микропланшет содержит фиксированные HIV-1/HIV-2 специфические синтетические пептиды рекомбинантный антиген.
2. **Отрицательный Контроль:** 1 фл. (1 мл). Обычная человеческая сыворотка, отрицательна к HBsAg и антителам к HCV, HIV-1 и HIV-2. Содержит азид натрия как
3. **Положительный Контроль:** 1 фл. (1мл). Дезактивированная человеческая сыворотка с антителами к HIV-1 высокого титра. Содержит азид натрия как консервант.
4. **Конъюгат,** 1 бут. (12 мл). Фосфатный буферизованный солевой раствор, содержащий нормальную козью сыворотку, стабилизатор белка и рекомбинант gp120, gp41, gp36 антигенный коньюгат пероксидазы хрена. Тимеросал использован как консервант.
5. **Промывочный раствор** (25x): 1 бут. (80 мл).
6. **Буфер субстрата:** 1 бут. (8 мл), содержащий перекись водорода.
7. **TMB:** 1 бут. (8 мл), лимоннокислый буфер, содержащий тетраметилбензидин (TMB) и диметилсульфоскид (DMSO).
8. **Стоп раствор**: 1 бут. (7 мл) 2M раствор серной кислоты.
9. **Накриватели планшета:** 4 шт., полиэтиленовые, для накрывания микропланшета в течение инкубации.
10. **Полиэтиленовая сумка и осушитель:** Для хранения неиспользованных полосок.
11. **Инструкция пользователя:** 1 копия.

Примечание: *Храните набор при 2-8°C. Приведите перед использованием все реагенты, кроме HIV-1/HIV-2 ИФА конъюгата, к комнатной температуре. Возьмите конъюгат из места хранения 2-8°C непосредственно перед использованием. Возвратите для хранения при 2-8°C сразу после использования.*

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. Не использовать набор после даты истечения срока годности.
2. Не заменять реагенты из одной партии на реагенты из другой.
3. Не пипетируйте ртом.
4. Используйте только реагенты по степени качества, неионизированную или дистиллированную воду, чтобы разбавить реагенты.
5. Не подвергать субстрат и TMB воздействию сильного света.
6. Избегайте контакта TMB и серной кислоты с любым окислителем или металлом.

7. Избегайте неоднократного открытия и закрытия инкубатора в течение этапов инкубации.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Обращайтесь с образцами, положительными и отрицательными контролями как с потенциально инфекционными носителями. Выполняя тестирование, надевайте лабораторные халаты и одноразовые перчатки. Выбрасывайте перчатки в емкости для биологически опасных отходов. После этого тщательно мойте руки.
2. Автоклавируйте все использованные и зараженные материалы при 121°C, 15psi в течение 30 минут перед утилизацией. Другой способ, дезинфицируйте материалы в 5% растворе гипохлорида натрия в течение 30-60 минут.
3. Немедленно вытрите любое опроливание 1% раствором гипохлорида натрия.
4. Стоп-раствор - сильная кислота. Вытрите пролитую жидкость немедленно. Промойте пролитую область водой. Если стоп-раствор вступил в контакт с кожей или глазами, промойте их большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью.

ПОДГОТОВОЧНЫЙ ЭТАП

1. Раствор рабочего субстрата

Раствор рабочего субстрата составляет пропорцию 1:1 раствора субстрата с ТМВ. Для каждых двух тестируемых полосок, добавляйте 1 мл ТМВ к 1 мл субстрата как указано в таблице ниже:

Кол-во используемых полосок	2	4	6	8	10	12
Кол-во HIV-1/HIV-2 буфера субстрата (мл)	1	2	3	4	5	6
Кол-во HIV-1/HIV-2 ТМВ раствора (мл)	1	2	3	4	5	6

Примечание:

1. Не смешивайте весь HIV-1/HIV-2 буфер субстрата с ТМВ раствором, поставляются дополнительные реагенты.
2. Рекомендуется использовать раствор рабочего субстрата через 20 минут.
3. Раствор рабочего субстрата должен быть бесцветным. Отчетливый синий цвет указывает, что раствор загрязнен. Избавьтесь от раствора рабочего субстрата и приготовьте свежий раствор в чистой емкости.

4. Промывочный раствор

Промывочный раствор (1X) составляет 1:25 разбавления концентрата промывочного раствора ИФА (25X), поставляемого с набором. Приготовьте промывочный раствор (1X) как нужно, добавляя 1 часть, концентрированного раствора (25X) к 24 частям неионизированой воды. Разбавленный промывочный раствор (1X) можно хранить при комнатной температуре до 1 недели.

Примечание: *Во время хранения концентрата промывочного раствора при 2-8°C могут образоваться кристаллы. Их необходимо растворить перед использованием путем подогревания до 37°C.*

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед началом процедуры анализа приведите все реагенты кроме конъюгата к комнатной температуре.
2. Извлеките планшет из алюминиевой сумки. Неиспользованные полоски положите назад с осушителем в запечатывающийся пакет, хранить при 2–8°C.
3. Перед использованием встряхните флаконы с образцами и контролями.
4. Внесите **100 мкл** отрицательного контроля в каждую из двух лунок, используйте для этого чистый наконечник.
5. Внесите **100 мкл** положительного контроля в каждую из трех лунок, используйте для этого чистый наконечник.
6. Используя пипетор, внесите **100 мкл** каждого образца в нужные лунки. В каждом тесте оставляйте две лунки как бланк и в эти лунки не вносите образец или конъюгат. Для каждого образца используйте чистый наконечник.
7. Накройте микропланшет накрывателем, чтобы минимизировать испарение и инкубируйте **60 минут при 37^{0}C.**
8. Извлеките конъюгат из места хранения при 2–8°C непосредственно перед использованием.
9. Осторожно снимите накрыватель, аспирируйте содержимое каждой лунки в емкость для биоопасных веществ. Перед утилизацией убедитесь, что в емкость внесено достаточное количество дезинфицирующего вещества.
10. Промойте планшет **5** раз разбавленным промывочным раствором. Проводите аспирацию каждый раз после последней промывки. Вытряхните перевернутый планшет на полотенца из абсорбирующей бумаги, чтобы удалить любую оставшуюся в лунках жидкость.
11. Внесите **100 мкл** раствора рабочего конъюгата в каждую лунку, содержащую образец или контроль.
12. Накройте микропланшет новым накрывателем и инкубируйте **30 минут при 37^{0}C.**
13. Приготовьте ратвор рабочего субстрата как указано выше.
14. Снимите и удалите накрыватель планшета. Повторите процедуру промывки как указано в этапе 10.
15. Добавьте **100 мкл** раствора рабочего субстрата на лунку. Накройте микропланшет новым накрывателем и инкубируйте **10 минут при 37^{0}C.**
16. Осторожно удалите накрыватель и для остановки реакции в каждую лунку добавьте **50 мкл** стоп раствора.
17. Считайте абсорбцию каждой лунки при **450 нм.** При использовании аппарата с двойным фильтром контрольная длина волны должна составлять **620 нм**.

Примечание:

1. Не нужно перервать анализ после его начала.
2. Абсорбцию нужно считать в течении 1 часа после добавления стоп раствора.
3. Не используйте микропланшетный промыватель для аспирации кислоты, и не аспирируйте кислоту в отбеливающее вещество.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Присутствие или отсутствие антител к HIV-1 и/или HIV-2, определяется соотношением значения абсорбции каждого образца к значению cut-off. Cut-off значение составляет 10% от среднего значения абсорбции положительных контролей.

1. Выполнение анализа правильно если:

1) В каждом анализе включен полный перечень бланков, положительных и отрицательных контролей.
2) Значения бланков должны иметь абсорбцию < 0.100
3) Значения отрицательного контроля должны иметь абсорбцию
< 0.080 и после вычитания бланка.
4) Значение положительного контроля Anti-HIV-1 должно иметь абсорбцию > 0.800 после вычитания бланка.

2. Вычисление контролей:

Среднее значение положительных контролей (PCx)
Определите среднее значение положительных контролей как указано в примере ниже:

Кол-во образцов положительного контроля	Абсорбция
1	1.125
2	1.330
3	1.227
Среднее значение положительных контролей (PCx)	1.227

3. Вычисление Cut-off Значения:

Cut-off значение составляет 10 % от среднего показателя положительных контролей. Вычислите Cut-off значение как показано в примере ниже:

PCx=1.227
Cut-off значение = 1.227 x 10 % = 0.123

4. Вычисление Образца

Вычислите абсорбцию каждого образца, вычитая бланк от каждого значения образца. Если коррекция бланка выполняется микропланшетным считывающим устройством, пропустите этот этап. Определите образец как показано в примере ниже:

Кол-во образцов	Абсорбция	ОП/КВ	
1	0.069	0.069/0.123=0.561	<1.00
2	0.482	0.482/0.123=3.919	>1.00

В примерах выше, образец № 1 (0.069) отрицательный и образец № 2 (0.482) - положительный для антител к HIV-1 и/или HIV-2 при сравнении с Cut-off значением 0.123.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Образцы со значениями абсорбции менее чем cut-off значение (ОП/КВ < 1.0) считаются отрицательным.
2. Образцы со значением начальной абсорбции больше или равной cut-off значению (ОП/КВ≥1.0) изначально согласно данного ИФА считаются положительными и перед интерпретацией должны повторно тестироваться в дубликате.
3. Если образцы, оказавшиеся положительными, после повторного тестирования могут интерпретироваться повторно положительными для антител к to HIV-1 и/или HIV-2, согласно критериев данного анализа.
4. Изначально реактивные образцы, отрицательные в обеих лунках при повторном тестировании считаются отрицательными для антител к HIV-1 или HIV-2.
5. Образцы, оказавшиеся постоянно положительными в даном ИФА должны далее тестироваться дополнительными, более специфическими тестами.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Повторно реактивные результаты в HIV-1/HIV-2 ИФА - основанны на предположении о наличии антител в образце. СПИД и СПИД-связанные состояния - клинические синдромы, и их диагноз может только быть установлен клиническим путем. Единичное тестирование не может использоваться для диагностики СПИДа, даже если рекомендуемое исследование реактивных образцов предполагает высокую вероятность наличия антитела к HIV-1/HIV-2.

Первоначальное использование HIV-1 и HIV-2 ИФА направлено на скрининг крови и плазмы, чтобы компоненты, содержащие антитело могли быть идентифицированы и извлечены, или ограничены в их дальнейшем применении для производства вне-впрыскиваемых изделиях.
Отрицательный результат тестирования на любом этапе исследования индивидуумов не препятствует предрасположению к или инфицированию HIV-1/HIV-2.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com