

ІНСТРУКЦІЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

DIA-HIV-p24-sensitive

тест-система імуноферментна
підвищеної чутливості

для кількісного визначення антигену ВІЛ1 (p24)

Набір T1-12

T-1807

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність антигену ВІЛ1 – p24 методом імуноферментного аналізу.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Тест-система являє собою набір, що включає наступні компоненти: *імуносорбент* – полістироловий планшет, в лунках якого сорбовані моноклональні антитіла до p24; *концентрат кон'югату №1* – біотинілювані поліклональні антитіла до антигену p24; *концентрат кон'югату №2* – пероксидазний кон'югат стрептавідину; *позитивний контроль* – очищений антиген p24 у відомій концентрації; *негативний контроль* – сироватка крові людини, яка не містить антиген p24, поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), антитіла до ВІЛ, вірусу гепатиту С та Тгепопета pallidum; *концентрат розчину для промивання* – концентрат фосфатно-сольового буферу, містить детергент; *розчин для розведення кон'югату №1* – фосфатно-сольовий буфер, містить детергент, казеїнову фракцію білків молока, блок-компоненти, барвник і консерванти; *розчин для розведення кон'югату №2* – фосфатно-сольовий буфер, містить детергент, барвник і консерванти; *розчин біотинтирамину* – боратний буфер, що містить біотинтирамін та перекис водню; *субстратний буфер* – цитратно-фосфатний буфер, що містить перекис водню; *хромозен* – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в розчині; *стоп-реагент* – розчин сірчаної кислоти.

Зовнішній вигляд компонентів: *імуносорбент* – планшет, що складається з 12 стрипів по 8 лунок з можливістю відокремлення кожної лунки; *концентрат кон'югату №1* – синя з незначною опалесценцією рідина; *концентрат кон'югату №2* – червона з незначною опалесценцією рідина; *позитивний та негативний контролю* – світло-жовті з незначною опалесценцією рідини; *концентрат розчину для промивання* – безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при нагріванні; *розчин для розведення кон'югату №1* – синя опалесцююча рідина; *розчин для розведення кон'югату №2* – червона опалесцююча рідина; *розчин біотинтирамину* – жовта прозора рідина; *субстратний буфер, розчин ТМБ, стоп-реагент* – прозорі безбарвні рідини.

Тест-система розрахована на проведення 96 аналізів, включаючи контроль, з можливістю використання планшета постріпово або використання частини стрипу на 12 постановок імуноферментного аналізу (12×8).

Принцип аналізу

Принцип аналізу DIA-HIV-p24-sensitive базується на методі твердофазного ІФА „сендвіч“-варіанту з додатковою ампліфікацією сигналу (введенням біотинтираміну-стрептавідинового підсилення).

При внесенні в лунки кон'югату та зразків досліджуваних сироваток антиген p24 у випадку його наявності зв'язується як зі специфічними антитілами на твердій фазі так і з поліклональними біотинілюваними анти-p24 антитілами в складі кон'югату №1, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Імунні комплекси анти-p24 специфічних антитіл та антигену p24 в подальшому виявляються кон'югатом стрептавідину з пероксидазою (кон'югат №2). Ампліфікація сигналу здійснюється за рахунок введення в систему біотинтирамину та додаткової інкубації з кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (при довжині хвилі 450 нм), яка пропорційна концентрації антигену p24 у зразках сироваток або плазми крові.

СКЛАД НАБОРУ

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	1 планшет (12×8)
2	Концентрат кон'югату №1 (11x)	1 амп. × 0,8 мл
3	Концентрат кон'югату №2 (11x)	2 амп. × 1,5 мл
4	Позитивний контроль, концентрація антигену p24 80 пг/мл	2 амп. × 1,4 мл
5	Негативний контроль	1 фл. × 10 мл

N	Назва компоненту	Кількість
6	Концентрат розчину для промивання (31x)	3 фл. × 25 мл
7	Розчин для розведення кон'югату №1	1 фл. × 8 мл
8	Розчин для розведення кон'югату №2	1 фл. × 28 мл
9	Розчин біотинтирамину	1 фл. × 15 мл
10	Субстратний буфер	1 фл. × 8 мл
11	Розчин ТМБ	1 фл. × 8 мл
12	Стол-реагент	1 фл. × 15 мл
13	Клейка плівка	3 шт.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°С;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Вимоги до промивання планшету:

- неякісне промивання планшету призводить до одержання некоректних результатів;
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватися повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові зберігають при температурі 2-8°С не більше 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°С) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

Проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 8 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°С протягом 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 5 мл розчину і розводять в 150 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°С до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°С не більше 10 діб.

1.2 Приготування розведень позитивного контролю (антигену p24) для будування калібрувальної кривої

Готують п'ять двократних розведень позитивного контролю згідно нижче наведеної таблиці.

№ стандарту	Концентрація p24, пг/мл	Позитивний контроль, мкл	Негативний контроль, мкл
1	80	200	0

№ стандарту	Концентрація р24, пг/мл	Позитивний контроль, мкл	Негативний контроль, мкл
2	40	100 №1	100
3	20	100 №2	100
4	10	100 №3	100
5	5	100 №4	100

1.3 Приготування розчину кон'югату №1

В чистий флакон відбирають 0,5 мл розчину для розведення кон'югату №1 (синій колір) та додають 50 мкл концентрату кон'югату №1 (синій колір). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.4 Приготування розчину кон'югату №2

В чистий флакон відбирають 1,0 мл розчину для розведення кон'югату №2 (червоний колір) та додають 100 мкл концентрату кон'югату №2 (червоний колір). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.5 Приготування розчину ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 0,5 мл хромогену ТМБ і додають 0,5 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно захищати від попадання прямого світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

2 Проведення аналізу

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.
- Для кількісного аналізу сироватки чи плазми крові на наявність р24 готують ряд послідовних розведень позитивного контролю згідно п.1.2.
- Готують розчин кон'югату №1 (синій колір) згідно п. 1.3.
- Звільняють необхідну кількість стрипів від упаковки, вставляють їх в рамку.

Невикористані стрипи необхідно щільно закрити в пакеті та використати протягом одного місяця. Невикористані стрипи зберігають при температурі 2-8 °С.

- В лунки вносять по 100 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 6 лунок першого ряду (лунки для контролів).
- В лунки А1-Е1 вносять по 100 мкл послідовних розведень позитивного контролю (80, 40, 20, 10, 5 пкг/мл), в одну лунку (F1) вносять 100 мкл негативного контролю.
- Додають в кожен лунку поверх досліджуваних та контрольних зразків сироваток по 50 мкл розчину кон'югату №1. По закінченні внесення кон'югату встановлюють планшет на автоматичний потрушувач та перемішують вміст лунок (при малій амплітуді потрушування) протягом 15-20 сек.
- Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 42 °С протягом 1 години.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату №2 (червоний колір) згідно п. 1.4.
- В усі лунки вносять по 100 мкл розчину кон'югату №2.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 18-25 °С протягом 15 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- В усі лунки вносять по 100 мкл розчину біотинтираміну.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 18-25 °С протягом 15 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату №2 (червоний колір) згідно п. 1.4.
- В усі лунки вносять по 100 мкл розчину кон'югату №2.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 18-25 °С протягом 15 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

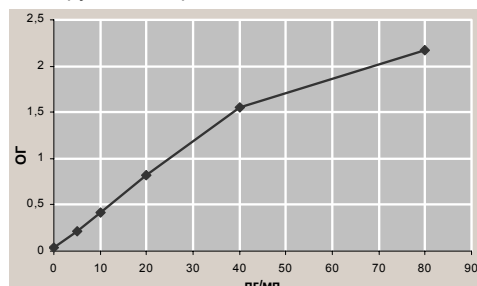
збавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

- Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.5.
- Вносять в лунки по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують його при температурі 18-25 °С в темному місці протягом 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
- Не більше як через 5 хвилин після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

ОГ можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в планшеті при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

- Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГ негативного контролю не перевищує 0,1 оптичної одиниці (ОО). А ОГ позитивного контролю з концентрацією 80 пг/мл не нижче 1,0 ОО.
- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину **0,1** до значення ОГК-.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше ГЗ.
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.
- Для кількісного аналізу результатів досліджень на наявність антигену р24 будують калібрувальну криву. Відкладають по осі Y значення оптичної густини шести контролів: негативного та п'яти позитивних (5, 4, 3, 2 та 1), а на осі X відповідні до них концентрації – 0, 5, 10, 20, 40 та 80 пг/мл.
- Використовуючи побудовану криву визначають концентрацію антигену р24 для кожного досліджуваного зразка згідно отриманому значенню оптичної густини.
- Приклад калібрувальної кривої:



Не використовуйте цей приклад замість кривої, отриманої в вашому аналізі

- Для автоматичного обліку результатів аналізів можуть бути використані відповідні комп'ютерні програми.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8 °С. Заморожувати набір не дозволяється.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору – 1 рік.

ФОРМА ВИПУСКУ – тест-набір.

Код АТС – V04CX.

ПАКУВАННЯ

- Імуносорбент вкладений в пакет з багатощарової та комбінованої плівки; пакет термозапаяний.
- Кон'югати, позитивний контроль розлиті в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.
- Негативний контроль розлитий в пластиковий флакон об'ємом 10 мл.
- Розчини крім розчину ТМБ розлиті у пластмасові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.
- Розчин ТМБ розлитий у флакони з пластмаси коричневого кольору об'ємом 15 мл.
- Набір компонентів разом з інструкцією з використання поміщений в коробку з гофрокартону з пластиковою вставкою.

ВИРОБНИК

АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“, 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицької, 35.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 або e-mail: tech@diapr.kiev.ua.

Рекламації на якість наборів надсилайте до ДП „Центр імунобіологічних препаратів“ за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.