

Genedia HIV 1/2 ELISA 3.0

Название и применение

Genedia HIV 1/2 ELISA 3.0 – это тест для качественного определения антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке и плазме человека.

Описание

В 1984 году, спустя 3 года после появления первых отчетов о болезни, которая стала известна потом как СПИД, исследователи описали главный каузальный вирусный агент, вирус человеческого иммунодефицита первого типа (ВИЧ-1). В 1986 году второй тип ВИЧ был выделен у больного СПИДом из Западной Африки. Оба вируса ВИЧ-1 и ВИЧ-2 имеют одни и те же пути передачи и связаны с одинаковыми оппортунистическими инфекциями и СПИДом. Дивергентный штамм ВИЧ-1, теперь характеризующийся как субтип 0, был найден в Камеруне, Северо-Западная Африка.

Как теперь известно, два родственных ретровируса, называемые ВИЧ-1 и ВИЧ-2 являются причиной возникновения синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД). Эпидемиологами было заявлено, что ВИЧ-1 уже распространен по всему миру, тогда как ВИЧ-2 принципиально был найден в Западной Африке, северо - европейских странах и Южной Африке. В связи с существующим серьезным спросом, наша компания разработала тест-набор для определения антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и недавно разработала тест-набор третьего поколения как продолжение разработок второго поколения. Новый тест-набор состоит из рекомбинантных ВИЧ антигенов и конъюгатов, т.е., рекомбинантных ВИЧ-1 (gp 41, p24) и ВИЧ-2 антигенов (gp36).

Состав набора (192 теста/набор)

1. Плашка, покрытая антигенами HIV 1/HIV 2: [96 лунок (8 лунок x 12 рядов)/плашка]x2

1 лунка содержит

Рекомбинантные HIV 1/HIV 2 антигены _____ 125 ul

Карбонатный буфер (растворитель) _____ сколько нужно

2. Отрицательный контроль: 1 бутылочка (1.0 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит

Нормальную сыворотку человека _____ 1 мл

Натрия азид (консервант) _____ 0.1 массо/объемн %

3. Положительный контроль: 1 бутылочка (1.0 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит

Инактивированная анти-HIV 1 сыворотка _____ 1 мл

Натрия азид (консервант) _____ 0.1 массо/объемн %

4. Растворитель для образца: 1 бутылочка (40 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит

Соль, содержащая фосфатный буфер _____ 32 мл

Тритон X-100 (сурфактант) _____ сколько нужно

Бычья сыворотка (протеиновый стабилизатор) _____ сколько нужно

Kathon CG (консервант) _____ 0.05 объемн%

5. Промывочный раствор (20 x концентрированный): 2 бутылочки (50 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит

Концентрированный PBS _____ 50 мл

Полисорбат (сурфактант) _____ сколько нужно

Kathon CG (консервант) _____ 0.05 объемн%

6. Конъюгат (51 x концентрат): 1 бутылочка (0.8 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит

Конъюгат рекомбинантных HIV 1/HIV 2 антигенов и пероксидазы _____ 0.8 мл

Альбумин бычьей сыворотки (протеиновый стабилизатор) _____ сколько нужно

Гентамицина сульфат (консервант) _____ 0.005 массо/объемн%

7. Растворитель конъюгата: 1 бутылочка (40 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит
Казеиновая соль с фосфатным буфером _____ 40 мл
Kathon CG (консервант) _____ 0.05 объемн%

8. Субстрат (101 x концентрат): 1 бутылочка (0.4 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит
Тетрамил бензидин _____ 3.4 мг
Диметил сульфоксид (растворитель) _____ 0.4 мл

9. Субстратный буфер: 1 бутылочка (40 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит
Водорода пероксид _____ 0.006 объемн%
Цитратно-фосфатный буфер (растворитель) _____ 40 мл

10. Приостанавливающий раствор: 1 бутылочка (40 мл/бутылочка)

1 бутылочка содержит
1.6 нормальная серная кислота _____ 40 мл

Описание

1. **Плашка, покрытая антигенами:** бесцветная полистириновая плашка;
2. **Отрицательный контроль:** жидкость светло- или темно-желтого цвета;
3. **Положительный контроль:** жидкость светло- или темно-желтого цвета;
4. **Растворитель для образца:** жидкость светло-коричневого или темно-желтого цвета;
5. **Промывочный раствор:** бесцветная или светло-желтая жидкость (может формироваться кристаллический осадок);
6. **Конъюгат:** бесцветная или светло-желтая жидкость;
7. **Растворитель конъюгата:** бесцветная или светло-желтая жидкость;
8. **Субстрат:** прозрачная бесцветная или светло-желтая жидкость (твердая при температуре ниже 18°C);
9. **Субстратный буфер:** бесцветная прозрачная жидкость;
10. **Приостанавливающий раствор:** бесцветная прозрачная жидкость;

Меры предосторожности и замечания

1. Тест-набор предназначен только для in-vitro диагностики
2. Храните образцы аккуратно во избежание инфицирования их неизвестными вирусами или ВИЧ;
3. Контаминация образцов микроорганизмами или сильный гемолиз могут обуславливать неправильный результат;
4. Используйте защитные перчатки при работе с потенциально биологически опасными материалами, после работы мойте руки в проточной воде;
5. Не допускайте соприкосновения субстрата с кожей;
6. Повторные циклы заморозки - разморозки могут привести к ложно отрицательному результату;
7. Избегайте микробного загрязнения реагентов при открытии бутылочек и заборе аликвот;
8. Все использованные образцы и материалы помещайте в автоклав и автоклавируйте минимум 1 час при температуре 121°C;
9. Жидкие отходы необходимо смешать с 1% натрия гидрохлоридом более чем на 1 час;
10. Пробы могут храниться при температуре 2-8 °C до трех дней или для длительного хранения должны быть заморожены при температуре ниже -15°C.

Сбор проб

1. Образцами служит сыворотка или плазма, все преципитаты и макрочастицы, такие как нематоциты или компоненты коагулята крови удалите с помощью центрифугирования.

- Использование в анализе мутных, гиперлипидемированных образцов или сильно гемолизированных образцов, а также нагревания может привести к получению неправильного результата тестирования.

Приготовление реагентов.

- Доведите все реагенты до комнатной температуры за 15-30 минут до начала тестирования.
- Достаньте необходимое количество тест-полосок из запечатанной плашки, покрытой ВИЧ антигенами и антителами, оставшиеся полоски необходимо хранить при температуре 2-8 °C в алюминиевом пакете с силикагелем.
- Приготовление промывочного раствора.
Приготовьте 1:20 раствор промывочного раствора путем разбавления дистиллированной или деионизированной водой до необходимого количества (например, прибавьте 10 мл промывочного раствора к 190 мл дистиллированной или деионизированной воды). При хранении в прохладном месте промывочный раствор может кристаллизоваться. Если кристаллизация произошла, используйте промывочный раствор после оттаивания его на водяной бане при температуре 37±1°C.
- Приготовление конъюгата.
Приготовьте необходимое количество 1:51 раствора конъюгата за 10 минут до начала тестирования путем добавления к Конъюгату Растворителя конъюгата (например, прибавьте, в расчете на одну полоску, 20 µl Конъюгата к 1 мл растворителя конъюгата). Хорошенько встряхивайте перед использованием.
- Приготовление субстрата.
После полного оттаивания на водяной бане при температуре 37°C (точка плавления 18°C), приготовьте 1:101 раствор субстрата, путем разбавления субстратным буфером, за 5-10 минут до начала тестирования (например, в расчете на одну полоску, прибавьте 10 µl субстрата к 1 мл субстратного буфера). Избегайте воздействия света.

Хранение и срок годности приготовленных и незапечатанных реагентов.

Реагенты	Хранение	Срок хранения
Промывочный раствор	2-8 °C	14 дней
Конъюгат	Комнатная температура	2 часа
Субстрат	Комнатная температура	2 часа

Хранение и срок годности распакованных реагентов

Реагенты	Хранение	Срок годности
Плашка, покрытая антигенами	2-8 °C	1 месяц
Отрицательный контроль	2-8 °C	1 месяц
Положительный контроль	2-8 °C	1 месяц
Растворитель образца	2-8 °C	1 месяц
Промывочный раствор	2-8 °C	1 месяц
Конъюгат	2-8 °C	1 месяц
Растворитель конъюгата	2-8 °C	1 месяц
Субстрат	2-8 °C	1 месяц
Субстратный буфер	2-8 °C	1 месяц
Приостанавливающий раствор	2-8 °C или комнатная температура	До истечения срока годности

Процедура тестирования

1. Возьмите необходимое количество тест-полосок и зафиксируйте их на штативе.
 2. Добавьте 100 µl растворителя образца в каждую лунку на плашке и добавьте 50 µl Отрицательного контроля в каждую лунку с 1A по 1C и 50 µl Положительного контроля в каждую лунку с 1D по 1E, соответственно. И затем, 50 µl каждого образца в оставшиеся лунки. Смешайте все с помощью шейкера для плашки при 1000 оборотов/мин. в течение 10 секунд.
- Следите за тем, чтобы содержимое лунок во время перемешивания с использованием шейкера не расплескалось и не смешалось друг с другом.
3. Инкубируйте при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 60 минут после накрытия плашки крышкой для плашки.
 4. За 5-10 минут до конца первой инкубации, приготовьте 1:51 раствор Конъюгата с помощью Растворителя конъюгата.
 5. Удалите содержимое всех лунок и промойте каждую лунку 5 раз с помощью 300 µl раствора Промывочного раствора (более, чем 300 µl на 1 лунку за 1 раз).
 6. Переверните плашку и поместите ее на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки промывочного раствора. Затем добавьте 100 µl приготовленного разбавленного Конъюгата в каждую лунку.
 7. Инкубируйте при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 минут после накрытия плашки крышкой для плашки.
 8. За 5-10 минут до конца первой инкубации, приготовьте 1:101 раствор Субстрата с помощью Субстратного буфера.
 9. Удалите содержимое всех лунок и промойте каждую лунку 5 раз с помощью 300 µl раствора Промывочного раствора (более, чем 300 µl на 1 лунку за 1 раз).
 10. Переверните плашку и поместите ее на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки промывочного раствора. Затем добавьте 100 µl приготовленного разбавленного Субстрата в каждую лунку и инкубируйте при комнатной температуре 30 минут. Избегайте воздействия света.
 11. Добавьте 100 µl Приостанавливающего раствора в каждую лунку и осторожно закройте плашку, чтобы позволить окраске стать однородной.
 12. Измерьте абсорбцию при 450 нм (относительная длина волны 620 нм) относительно воздуха в течение 30 минут после добавления Приостанавливающего раствора.

Достоверность результатов тестирования.

Средняя абсорбция (PCx) Положительного контроля должна быть больше или равна 1.0 и средняя абсорбция (NCx) Отрицательного контроля должна быть меньше или равна 0.200. Если результаты измерений выходят за указанные пределы, тестирование должно быть проведено еще раз.

Интерпретация результатов.

1. Вычисление порогового объема.

1) Вычисление значения Отрицательного контроля (NCx)

Пример: 1 абсорбция Отрицательного контроля _____ 0.051

2 абсорбция Отрицательного контроля _____ 0.054

3 абсорбция Отрицательного контроля _____ 0.048

Значение Отрицательного контроля (NCx) = $(0.051 + 0.054 + 0.048)/3 = 0.051$

2) Вычисление порогового объема

Пороговый объем = $(NCx) + 0.3 = 0.051 + 0.3 = 0.351$

2. Интерпретация

Образец с абсорбцией более или равной пороговому объему считается положительным к Анти-ВИЧ - 1/2 и образцы с абсорбцией менее порогового объема считаются отрицательными к Анти-ВИЧ-1/2.

- Если образцы считаются положительными, тестирование необходимо провести еще два раза. Если повторное тестирование показывает отрицательный результат, образцы считаются

отрицательными, с другой стороны, если хотя бы одно из повторных тестирований дает положительный результат, образцы считаются положительными.

- Для окончательного заключения, образцы, которые считаются положительными, должны быть протестированы по методу western blot или другим подтверждающим методом.

Состав набора

Набор	48	96	192	480	960
Реагенты					
Плашка, покрытая антигенами	0.5 плашки	1 плашка	2 плашки	5 плашек	10 плашек
Отрицательный контроль	0.3 мл*1	0.75 мл*1	1.0 мл*1	1.5 мл*1	3 мл*1
Положительный контроль	0.3 мл*1	0.75 мл*1	1.0 мл*1	1.5 мл*1	3 мл*1
Растворитель образца	10 мл*1	20 мл*2	40 мл*1	100 мл*1	120 мл*1
Промывочный раствор	25 мл*1	25 мл*1	50 мл*2	100 мл*2	150 мл*2
Конъюгат	0.2 мл*1	0.4 мл*1	0.8 мл*1	2.0 мл*1	2.5 мл*1
Растворитель конъюгата	10 мл*1	20 мл*1	40 мл*1	100 мл*1	120 мл*1
Субстрат	0.2 мл*1	0.2 мл*1	0.4 мл*1	1.0 мл*1	1.3 мл*1
Субстратный буфер	20 мл*1	20 мл*1	40 мл*1	100 мл*1	120 мл*1
Приостанавливающий раствор	10 мл*1	20 мл*1	40 мл*1	100 мл*1	120 мл*1

Набор	4800	10 080	100 032	200 064
Реагенты				
Плашка, покрытая антигенами	50	105	1 060	2 120
Отрицательный контроль	44 мл	31.5 мл	316 мл	636 мл
Положительный контроль	44 мл	31.5 мл	316 мл	636 мл
Растворитель образца	1100 мл	2100 мл	21200 мл	41400 мл
Промывочный раствор	2750 мл	4200 мл	42400 мл	84800 мл
Конъюгат	28 мл	42 мл	424 мл	848 мл
Растворитель конъюгата	1375 мл	2100 мл	21200 мл	42400 мл
Субстрат	16.5 мл	21 мл	212 мл	424 мл
Субстратный буфер	1375 мл	2100 мл	21200 мл	42400 мл
Приостанавливающий раствор	1100 мл	2100 мл	21200 мл	42400 мл

Хранение

Хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности

15 месяцев с даты производства.