

**Диагностический тест-набор для определения антител и антигенов к вирусу
иммунодефицита человека.
LG Anti-HIV 1/2 Plus ELISA**

Энзиматический иммуноанализ для определения ВИЧ p24 антигенов и антител ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВИЧ-1 группы 0 в сыворотке и плазме человека.

Вирус иммунодефицита человека является причиной возникновения синдрома иммунодефицита у человека (СПИД), который впервые был распознан в 1981 году. Были выделены и изучены два типа вируса. В 1983 году ВИЧ-1 впервые был выделен из лимфоцитов пациента во Франции, новый тип вируса, названный в последствии ВИЧ-2 был выделен в 1986 году. ВИЧ-1 был к тому времени уже распространен по всему миру, тогда как ВИЧ-2 принципиально был обнаружен в Западной Африке. ВИЧ-1 делится на две группы: М группа, включающая 10 субтипов (с А по J) и 0 группа. ВИЧ-1 группы 0 в исходном виде был выделен у пациента из Камеруна и уже был распространен к тому времени по всему миру.

Некоторые исследования показали, что широко используемые HIV-1/2 скрининговые тесты не чувствительны к анти-ВИЧ-1 группы 0 антителам. Следовательно, тесты нужны для того, чтобы повысить чувствительность для анти-ВИЧ-1 группы 0 антител.

В период раннего инфицирования, p24 антигены обнаруживаются за 1-2 недели до того, как тесты на антитела становятся положительными. Таким образом, определение p24 антигенов может снижать период сероконверсии окна. Эта комбинация, когда вместе определяются антигены и антитела снижает риск трансмиссии.

LG Anti-HIV 1/2 Plus ELISA является *in vitro* энзимосвязанным иммуносорбентным анализом (ELISA) для качественного определения антител ВИЧ в сыворотке и плазме человека. Этот набор 3-го поколения состоит из рекомбинантного ВИЧ протеина (ВИЧ-1 p24, ВИЧ-1 gp41, ВИЧ-2 gp36, ВИЧ-1 группы 0 gp41) и способен обнаруживать антитела к ВИЧ-1 группы 0 также как ВИЧ-1/-2, тест показывает отличную чувствительность и специфичность.

[Принцип]

В **LG Anti-HIV 1/2 Plus ELISA**, ВИЧ антитела в тестируемом образце связываются с рекомбинантными ВИЧ антигенами, иммобилизованными в микролунках. (1-ая реакция) После промывки конъюгат (помеченные пероксидазой рекомбинантные антигены) реагирует с ВИЧ антителами захваченными в микролунке. (2-ая реакция)

После промывки, следующим этапом следует реакция с субстратом, в результате которой развивается окрашивание. Это происходит потому, что раствор ТМВ, содержащий пероксид водорода, добавляется в лунки. Если связанный рекомбинантный антиген-HRP присутствует, ТМВ окислится, что приведет к появлению светло-голубого окрашивания, интенсивность которого зависит от количества связанных рекомбинантных антигенов-HRP. Это пропорционально количеству анти-ВИЧ антител, присутствующих в тестируемом образце. Субстратная реакция останавливается при добавлении приостанавливающего раствора (желтое окрашивание). Интенсивность окрашивания может быть измерена прибором для считывания (спектрофотометром) при 450 нм.

[Описание]

1. Плашка с микролунками, покрытая ВИЧ рекомбинантными антигенами: бесцветная полистириновая плашка
2. Концентрат конъюгата (50x): бесцветная или светло-желтая жидкость
3. Положительный контроль: бесцветная или светло-желтая жидкость
4. Отрицательный контроль: бесцветная или светло-желтая жидкость
5. Растворитель для образца: бесцветная или светло-желтая жидкость
6. Растворитель конъюгата: красная жидкость

7. ТМВ концентрат (100x): бесцветная или светло-желтая жидкость
8. Раствор субстратного буфера: бесцветная жидкость
9. Приостанавливающий раствор: бесцветная жидкость
10. Промывочный концентрат (20x): бесцветная жидкость
11. Крышка для плашки: бесцветный прозрачный адгезивный пластик

[Применение]

Определение антител и антигенов к ВИЧ

[Состав]

MP/HIV Ag

1. Плашка с микролунками, покрытая ВИЧ рекомбинантными антигенами (ВИЧ-1 gp41, Комбо ВИЧ-1 p24-gp41-ВИЧ-2-gp36 антиген, рекомбинантный ВИЧ-1 группы 0 gp41 антиген)

Conjugate/CONC /50x

2. Меченные пероксидазой ВИЧ рекомбинантные антигены.
Консервант: Гентамицина сульфат

Control/P

3. Положительный контроль
Инактивированная сыворотка или плазма человека, содержащая анти-ВИЧ антитела, и неактивная к HBs-антигенам и анти-HCV антителам.
Консервант: Гентамицина сульфат

Control/N

4. Отрицательный контроль
Инактивированная сыворотка или плазма человека, содержащая неактивные к анти-ВИЧ 1/2 антитела, ВИЧ антигены, HBs и анти-HCV антитела.
Консервант: Гентамицина сульфат

Sample/DIL

5. Растворитель образца
Подобранный буфер с Тритоном X-100, стабилизированный.
Консервант: 2-Хлороацетамид.

Conjugate/DIL

6. Растворитель конъюгата
Трис-буфер с полисорбатом 20 и стабилизированный.
Консервант: Гентамицина сульфат

TMB/CONC/100x

7. ТМВ концентрат (100x)
ТМВ концентрат (тетрамитил бензидин)

Substrate/DIL

8. Раствор субстратного буфера
Цитратный буфер с водорода пероксидом

Stop/SOLN

9. Приостанавливающий раствор
Серная кислота

Wash/SOLN/20x

10. Промывочный концентрат (20x)

Соляной раствор с фосфатным буфером и полисорбатом 20.

Sealer

11. Одноразовый неадгезивный пластик или бумажная крышка.

[Метод]

1. Приготовление реагентов

(1) Приготовление промывочного раствора

Прежде, чем приступить к тестированию, приготовьте необходимое количество промывочного раствора двадцатикратным разбавлением промывочного концентрата дистиллированной или де ионизированной водой. Для каждой микролунки понадобится примерно 3 мл промывочного раствора, но может понадобиться и большее количество, все зависит от метода промывки и используемого инструментария. В случае использования автоматического оборудования, в дополнение к обычному количеству, необходимому для промывки, приготовьте дополнительно 200 мл промывочного раствора. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при комнатной температуре. Для продолжительного хранения храните его при температуре 2-8 °С.

Внимание: Для приготовления промывочного раствора используйте только дистиллированную или де ионизированную воду. Однако получение де ионизированной воды с помощью полистириновой ионно-обменной резины недопустимо, т.к. данный способ получения может привести к инактивации HRP. Избегайте использования для хранения металлических контейнеров.

(2) Приготовление раствора конъюгата

Перед тестированием приготовьте необходимое количество конъюгата путем разбавления конъюгата (50x) растворителем конъюгата. Для одной плашки добавьте 300 µl конъюгата (50x) к 15 мл растворителя конъюгата. Этот раствор стабилен в течение 8 часов при комнатной температуре.

(3) Приготовление раствора субстрата

Перед проведением тестирования приготовьте необходимое количество раствора субстрата путем разведения ТМВ концентрата (100x) раствором субстратного буфера. Для одной плашки добавьте 150 µl ТМВ концентрата к 15 мл раствора субстратного буфера. В случае использования инструментов для перемешивания раствора, объем раствора должен быть увеличен, т.е. приготовьте дополнительно 5 мл раствора субстрата. Используйте стаканы не содержащие металл или пластиковые контейнеры для разведения ТМВ раствора и всегда мойте их дистиллированной водой перед использованием, чтобы предотвратить контакт с металлоионами, присутствующими в водопроводной воде. Полученный раствор стабилен в течение 4 часов при комнатной температуре в темном месте, но если цвет раствора поменялся на голубой, необходимо приготовить свежий раствор.

Внимание:

- Избегайте использования металлических контейнеров или пипеток, которые могут привести к окрашиванию приготовленного раствора субстрата.
- Избегайте любого контакта ТМВ концентрата с телом, т.к. он содержит ДМСО (диметилсульфоксид), и не добавляйте его в лунки без разбавления буфером.

- Будьте осторожны, чтобы не загрязнить раствор субстрата натрия азидом, часто используемым в качестве консерванта, который также является ингибитором HRP.
- ТМВ концентрат может замерзнуть в процессе хранения в холодильнике, но после полного оттаивания может быть использован.

2. Подготовка тестируемого образца

- (1) В данном исследовании могут использоваться сыворотка или плазма, а также твердые материалы, также как кровяные частицы и компоненты кровяного коагулята, которые могут быть получены путем центрифугирования и сразу же протестированы.
- (2) Обычные антикоагулянты, такие как ЭДТА, цитрат и гепарин не влияют на результаты метода.
- (3) Избегайте образцов, содержащих ингибиторы HRP (т.е. натрия азид, который часто используется в качестве консерванта), это может привести к ложноположительному результату тестирования
- (4) Для кратковременного хранения образца (в течение 2-х недель) храните его при температуре 2-8 °С или для длительного хранения при температуре ниже -15°С.
- (5) Обращайте особое внимание на гемолизованные образцы и образцы, подвергшиеся микробному обсеменению, т.к их использование может привести к получению неточного результата.

3. Условия хранения и срок годности реагентов.

- (1) Храните все реагенты при 2-8 °С и используйте их до истечения срока годности, указанного на упаковке. Приостанавливающий раствор может храниться при комнатной температуре, и стабилен при комнатной температуре в течение 1 года.
- (2) Перед использованием все реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (15-30 °С) и должны быть опять помещены в холодильник после использования. Особенно опасно открытие плашек при пониженной температуре, это может привести к увлажнению лунок, что осложнит их дальнейшее использование, т.е. плашки должны быть открыты только после доведения их температуры до комнатной и должны храниться при температуре 2-8 °С сразу после десикации (осушения) и запечатывания. Поскольку тестовые лунки, хранящиеся с избытком влаги, могут потерять активность даже при хранении в холодильнике, нужно соблюдать особую осторожность.
- (3) Инструкция по условиям хранения для приготовленных реагентов

Приготовленные реагенты	Условия хранения	Срок годности
Раствор субстрата	Комнатная температура	4 часа
Промывочный раствор	Комнатная температура/ 2-8 °С.	30 дней/ 3 месяца

- Держите вдали от яркого света при инкубации и хранении
 - Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Если он стал голубого цвета, он не может быть использован.
- (4) Все компоненты пригодны для использования до истечения срока годности, когда хранятся при температуре 2-8 °С, но плашку с микролунками рекомендуется хранить при 2-8 °С в запечатанном пакете с десикантом и использовать в течение 1 месяца после открытия. Отрицательный контроль, положительный контроль антител, положительный контроль антигенов, конъюгат 1, конъюгат 2 (51x) и растворитель конъюгата 2 рекомендуется хранить при 2-8 °С и использовать в течение 3 месяцев после открытия.

4. Процедура тестирования

- (1) Доведите температуру диагностических реагентов до комнатной температуры как минимум за 30 минут до начала тестирования и работы с лунками. Тест-плашка должна быть открыта только после того, как ее температура достигла комнатной. Определите количество лунок, необходимое вам для проведения тестирования. Для каждого необходимо взять в дополнение к количеству лунок по количеству тестируемых образцов дополнительно 6 лунок (3 для отрицательного контроля, 2 для положительного контроля, 1 пустая лунка для субстрата). Неиспользованные лунки должны храниться в запечатанном пакете, снабженном застежкой из фольги и содержащем десикант. Не прикасайтесь к кнопке лунки на полоске.

Внимание: Если во время добавления реагентов или промывке полоски в плашку вставлены неаккуратно, процесс тестирования может остановиться или совершить «скачок».

Чтобы быть уверенным в каждом этапе тестирования, необходимо правильно устанавливать каждую полоску.

- (2) После записи расположения лунок для контрольных реагентов и тестируемых образцов, добавьте 100 μ l растворителя образца в каждую лунку кроме пустой лунки для субстрата.
- (3) Добавьте по 50 μ l реагентов отрицательного контроля, положительного контроля и тестируемые образцы в каждую лунку, хорошенько встряхните в течение 5-10 секунд, чтобы убедиться в отсутствии утечки и накройте плашку крышкой.
- (4) Инкубируйте закрытую плашку при 37 ± 1 °C в течение 60 ± 5 минут.
- (5) После завершения реакции, снимите крышку с плашки и 5 раз промойте лунки следующим образом: сначала извлеките из лунок любые оставшиеся в них частицы с помощью аспиратора, затем заполните полностью раствором для промывки и повторите процесс аспирации, заполняйте лунки промывочным раствором еще 4 раза, затем полностью очистите лунки с помощью аспиратора. Переверните плашку и выньте абсорбент, чтобы удалить избыток промывочного раствора.

Внимание:

- Прежде, чем приступить к следующему этапу тестирования, убедитесь в том, что все полоски установлены в плашку правильно, потому что полоски могут выпасть из плашки при снятии с нее крышки. Устройство может дать сбой в работе, если полоски установлены неправильно.
 - Очень важно, чтобы перед полным удалением промывочного раствора плашка была им наполнена более, чем на 5-15 секунд. Кроме того, убедитесь, что после промывки в плашке не осталось промывочного раствора.
- (6) Добавьте 100 μ l раствора конъюгата во все лунки, кроме пустой лунки для субстрата и закройте плашку крышкой.
 - (7) Инкубируйте закрытую плашку при 37 ± 1 °C в течение 30 ± 1 минут.
 - (8) После окончания реакции, снимите крышку с плашки, удалите любые оставшиеся в них частицы с помощью аспиратора и промойте 5 раз с помощью промывочного раствора. Переверните плашку и удалите абсорбент для удаления избытка промывочного раствора.
 - (10) Добавьте 100 μ l раствора субстрата во все лунки, включая пустую лунку для субстрата.
 - (11) Инкубируйте при 15-30 °C в темном месте в течение 30 ± 1 мину.
 - (12) Добавьте 100 μ l приостанавливающего раствора во все лунки, включая лунку для субстрата.

Внимание: Оптическая плотность (ОП) должна быть измерена в течение 1 часа после добавления приостанавливающего раствора, т.к. некоторые изменения ОП могут возникнуть даже после остановки реакции.

- (13) Если необходимо, удалите влагу с плашки с помощью абсорбирующей ткани. Прочитайте микроплашку при длине волны 450 нм. Для двойных длинноволновых считывателей выберите длину волны от 620 нм до 650 нм.

5. Интерпретация результатов.

(1) Вычисление средней ОП отрицательного контроля (NCx)

Средняя оптическая плотность может быть рассчитана путем усреднения значений трех оптических плотностей, полученных путем измерения ОП отрицательного контроля в соответствии с пунктом 4 Процедуры тестирования.

Пример:

№ отрицательного контроля	Оптическая плотность (450 нм)
1	0.025
2	0.029
3	0.027
Всего	0.081

- Средняя ОП отрицательного контроля $NCx = 0.081/3 = 0.027$
 - 1) ОП отрицательных контролей должны быть больше или равны -0.005 и меньше или равны 0.200. Если ОП измерена и оказалась между 0.005 и 0.000, она должна быть округлена до 0.000 для вычисления средней ОП.
 - 2) Если одно из трех значений выходит за указанный предел, пересчитайте значение средней ОП, основываясь на двух других значениях.
 - 3) Если два или более значений ОП выходят за указанный предел, тест должен быть повторен.

(2) Вычисление средней ОП положительного контроля (PCx)

Средняя оптическая плотность может быть рассчитана путем усреднения значений двух оптических плотностей, полученных путем измерения ОП положительного контроля в соответствии с пунктом 4 Процедуры тестирования.

Пример:

№ отрицательного контроля	Оптическая плотность (450 нм)
1	1.723
2	1.735
Всего	3.458

- Средняя ОП положительного контроля $PCx = 3.458/2 = 1.729$
 - 1) ОП положительных контролей должны быть больше или равны 0.800 и различия в значениях ОП двух измерений должны быть меньше или равны 0.65.
 - 2) Если значения ОП положительных контролей выходят за пределы указанного значения, тест должен быть повторен.

(3) Вычисление порогового значения

Пороговое значение вычисляется путем прибавления к средней ОП 0.3

Пример: Пороговое значение = $NCx + 0.3 = 0.027 + 0.3 = 0.0327$

(4) Интерпретация и оценка результатов.

- 1) Образцы со значением ОП менее порогового значения считаются нереактивными и не подходящими для перетестирования.

2) Образцы с ОП больше или равной пороговому значению считаются в начальной стадии реактивными и должны быть перетестированы двукратно (дубликаты) перед официальной интерпретацией результатов и определения относительно следующих критериев: первое, образец считается повторно положительным, если значение обеих ОП дубликатов больше или равно пороговому значению; второе, образец считается отрицательным, если оба значения ОП дубликатов меньше порогового значения.

3) Для тест-образцов со значением ОП близким к пороговому значению (пороговое $\pm 10\%$), рекомендуется перетестировать через 4-8 недель с использованием новых образцов крови.

[Внимание]

1. Не используйте реагенты из наборов с разными номерами, кроме приостанавливающего раствора и промывочного концентрата.
2. Во время использования микропипетки при добавлении образцов, используйте новый наконечник для пипетки каждый раз для каждого нового образца или реагента, которые надо добавить.
3. Если тест начат, не позволяйте микролункам стать сухими
4. Образцы должны тестироваться в одних и тех же условиях, как и положительные и отрицательный контроли и пустая лунка для субстрата. Даже в случае тестирования нескольких плашек одновременно, проводите все тестирования с использованием пустой лунки для субстрата, положительного и отрицательного контролей, включая их во все плашки.
5. Оставшиеся реагенты и лунки должны быть использованы или храниться при должных условиях с учетом срока годности.
6. Закройте застежку из фольги сразу, как только необходимое число лунок извлечено из плашки.

[Меры предосторожности]

1. Если отмечено, что произошла утечка положительных или отрицательных контрольных образцов, продезинфицируйте указанные контейнеры 1% раствором натрия гипохлорида в течение 30 минут и утилизируйте их как биологически-опасные отходы.
2. Во избежание инфицирования в результате непрямого контакта, всегда начинайте тестирование на пластиковом коврикe или на другой подложке и после завершения тестирования либо сожгите его, либо утилизируйте после прокаливания при 120°C в течение 20-30 минут.
3. Надевайте одноразовые пластиковые перчатки каждый раз, когда берете диагностические реагенты и образцы крови.
4. Не втягивайте ртом через пипетку диагностические реагенты
5. Курение, прием пищи и питья во время работы с диагностическими реагентами и образцами крови не допускается.
6. Такие инструменты, как иглы и ножницы и др., которые могут поранить человека их использующего, не должны находиться рядом во время работы с диагностическими реагентами и образцами крови.
7. Аккуратно берите все реагенты и образцы во избежание разбрызгивания содержимого при открывании крышки контейнера и предотвращайте попадание реагентов и образцов в рот (надевайте маску).
8. Надевайте маску, одноразовые перчатки во время промывки плашки и аккуратно держите ее, чтобы избежать контакта реагентов и образцов с поверхностью рта.
9. После использования все отходы должны быть простерилизованы при 120 °C в течение 20-30 минут и утилизированы.

[Как поставляется]

Состав набора	48 тестов/набор	96 тестов/набор	192 теста/набор	480 тестов/набор
Плашка с микролунками, покрытая HIV1, HIV2, HIV1 группы 0 рекомбинантными антигенами	0.5 плашки	1 плашка	2 плашек	5 плашек
Концентрат коньюгата	0.3 мл, 1 бутылочка	0.4 мл, 1 бутылочка	0.8 мл, 1 бутылочка	2.0 мл, 1 бутылочка
Положительный контроль	0.5 мл, 1 бутылочка	0.8 мл, 1 бутылочка	2.0 мл, 1 бутылочка	4.0 мл, 1 бутылочка
Отрицательный контроль	0.5 мл, 1 бутылочка	0.8 мл, 1 бутылочка	2.0 мл, 1 бутылочка	4.0 мл, 1 бутылочка
Растворитель для образца	10 мл, 1 бутылочка	20 мл, 1 бутылочка	40 мл, 1 бутылочка	80 мл, 1 бутылочка
Растворитель для коньюгата	10 мл, 1 бутылочка	20 мл, 1 бутылочка	40 мл, 1 бутылочка	100 мл, 1 бутылочка
ТМВ концентрат	0.3 мл, 1 бутылочка	0.4 мл, 1 бутылочка	0.8 мл, 1 бутылочка	1.0 мл, 1 бутылочка
Субстратный буфер	20 мл, 1 бутылочка	40 мл, 1 бутылочка	80 мл, 1 бутылочка	100 мл, 1 бутылочка
Приостанавливающий раствор	15 мл, 1 бутылочка	30 мл, 1 бутылочка	60 мл, 1 бутылочка	100 мл, 1 бутылочка
Очищающий концентрат	25 мл, 1 бутылочка	50 мл, 1 бутылочка	100 мл, 1 бутылочка	100 мл, 2 бутылочки
Крышка для плашки	3 шт.	5 шт.	5 шт.	10 шт.

[Срок годности]

12 месяцев

[Хранение]

Хранить при температуре 2-8 °С в холодильнике.

[Значение символов]



Номер партии



Хранить при температуре 2-8 °С



Вреден, вызывает раздражение



Дата выпуска



Инструкция по применению



Внимание, перед использованием прочитайте инструкцию



Использовать до

LG Life Sciences Ltd.

20, Yoido-dong, Youngdungpo-gu, Seoul 150-721, Korea