

«УТВЕРЖДАЮ»

**Зам. Генерального директора
ООО «Био-Рад Лаборатории»**

Яшина Т.В. 

2011 г.



**Инструкция по применению изделия медицинского
назначения**

**«Тест-системы «НЬЮ ЛАВ БЛОТ» (NEW LAV BLOT)
для выявления антител к индивидуальным белкам ВИЧ1 и
ВИЧ2 в сыворотке или плазме крови человека методом
иммуноблоттинга».**

2011

BIO-RAD

NEW LAV-BLOT I
НЬЮ ЛАВ БЛОТ I
18 определений

72251

**ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ
БЕЛКАМ ВИЧ 1 ТИПА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА**

Для диагностики in vitro

Контроль качества производителем

Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья и до продажи продукта пользователю.

*Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям. Документы о производстве и контроле каждой серии хранятся в компании **БИО-РАД (BIO-RAD)**.*

Адрес представительства в России:

125167 Москва Ленинградский пр-т, 37А, стр. 14

Тел.: (495) 721 14 04, Факс: (495) 721 14 12, e-mail: post@bio-rad.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1. ПРИМЕНЕНИЕ	3
2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ	3
3. ПРИНЦИП МЕТОДА	3
4. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
6. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ	5
7. НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С ДАННЫМ НАБОРОМ, МАТЕРИАЛЫ	7
8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ И ИХ ХРАНЕНИЕ	7
9. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	7
10. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА	8
11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	9
12. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА	11
13. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА	11
14. ЛИТЕРАТУРА	12

1. ПРИМЕНЕНИЕ

Нью Лав Блот I (NEW LAV-BLOT I) – набор, предназначенный для выявления анти-ВИЧ1-антител в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноблоттинга с целью подтверждения положительного ответа на наличие антител к ВИЧ1 и характеристики антигенной специфичности при диагностике СПИДа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) был описан и определен как заболевание с характерным комплексом симптомов в 1981 году. Из лимфоцитов больных СПИДом как на стадии проявления клинических признаков, так и в продромальный период были выделены три ретровируса (LAV, HTLV III, ARV), которые относятся к группе лентивирусов и не дифференцируются обычными серологическими тестами. В 1986 году было принято решение объединить эти три вируса под одним общим термином – “вирус иммунодефицита человека” (ВИЧ).

Основными путями передачи вируса являются половой и трансфузионный. В международной практике здравоохранения была внедрена система законодательных мер по ограничению распространения вируса; обязательный вирусный контроль донорской крови дал возможность выбраковки потенциально инфицированных образцов.

Скрининговые исследования основаны на выявлении антител в сыворотке или плазме с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА). Качество антигенов, используемых в этих ИФА тест-системах, не позволяет полностью исключить неспецифический результат. Учитывая тяжесть диагноза, необходимо осуществлять подтверждение или опровержение результатов скрининга с использованием других методик. Эксперты ВОЗ рекомендуют для этого использовать метод иммуноблоттинга (Western Blot).

Этот метод позволяет дифференциально выявлять антитела против каждого белка вируса, и, следовательно, подтвердить серопозитивность образца или выявить возможные неспецифические реакции.

Набор Нью Лав Блот I содержит все необходимые реагенты для выполнения подтверждения методом иммуноблоттинга.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на принципе непрямого ИФА, выполняемого на нитроцеллюлозной мембране-стрипе, содержащей все белки ВИЧ1 вируса и полосу внутреннего контроля, содержащую антитела к IgG. Полоса, соответствующая внутреннему контролю теста, расположена в нижней части нитроцеллюлозной мембраны с противоположной от маркировки стороны, перед полосой, соответствующей белку р18. Данная полоса служит для определения правильности внесения образца и реагентов, а также правильности выполнения протокола исследования.

Инактивированные белки вируса ВИЧ1 разделяются по молекулярному весу методом электрофореза в полиакриламидном геле в диссоциирующей и восстанавливающей среде и в последующем переносятся на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса.

Методика включает следующие этапы:

1. Регидратация стрипов.

2. Инкубирование стрипа и подтверждаемых образцов или контрольных сывороток.
Антитела к ВИЧ1, при их наличии в образце, связываются с белками вируса, переносимыми на стрип.
3. После промывки добавляют антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой и инкубируют. Конъюгат взаимодействует с антителами к ВИЧ1, связавшимися с твердой фазой подложки.
4. После промывки и удаления избытка конъюгата, комплексы, связанные с нитроцеллюлозной мембраной, окрашиваются в результате ферментативной реакции конъюгата и раствора субстрата.
5. Появление специфически окрашенных полос на мембране позволяет регистрировать наличие антител к ВИЧ 1 в образце.

4. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Все реагенты набора предназначены для диагностики in vitro.

Набор рассчитан на 18 определений, которые можно проводить отдельно.

Метка	Реагент	Форма выпуска
R1	Нитроцеллюлозные стрипы ВИЧ1 Нанесены белки вируса ВИЧ1 и внутренний анти-IgG контроль. Стрипы помещены в одноразовые лотки.	18 стрипов в 3 лотках (по 6 стрипов в каждом лотке)
R2	Промывочный раствор/ растворитель (x 5) Концентрированный 5х Содержит 0,5% хлороформ	1 флакон 100 мл
R3	Отрицательная контрольная сыворотка. Сыворотка человека, не содержащая антитела к ВИЧ, антитела к ВГС и антиген HBs. Консервант: < 0,1% азид натрия	1 флакон 0,2 мл
R4	Анти-ВИЧ1 положительная контрольная сыворотка. Сыворотка человека* содержащая антитела к ВИЧ1 и не содержащая антитела к ВГС и антиген HBs, инаktivированная нагреванием. Консервант: < 0,1% азид натрия	1 флакон 0,2 мл
R5	Конъюгат Козьи антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой. Консервант: 0,1% азид натрия	1 флакон 40 мл
R6	Субстратный раствор (BCIP/NBT) 5Бром-4Хлор-3-Индолил-Фосфат (BCIP) и нитро-тетразолин синий (NBT), содержащийся в растворе как цветовой индикатор реакции	1 флакон 40 мл

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices):

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте реагенты из различных партий при выполнении определенного теста.

Примечание: Для проведения теста промывочный раствор (маркировка R2, синего цвета) и субстратный раствор (R6) можно с ограничениями использовать из другой, близкой по дате выпуска партии. Обратитесь в нашу службу поддержки пользователей за детальной информацией.

- Перед использованием необходимо выдержать реагенты 30 минут для их стабилизации при комнатной температуре (18-30°C).
- Аккуратно разведите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Не проводите тест в присутствии паров реактивов (пары кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут изменять ферментативную активность конъюгатов.
- Используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую деионизированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду.
- Используйте новый наконечник для внесения каждой пробы.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для конъюгата и субстратного раствора.
- Не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.
- Используйте пипетки и оборудование, прошедшие метрологическую проверку.
- Не изменяйте протокол исследования.
- Контрольные сыворотки должны использоваться параллельно с исследуемыми образцами в каждом исследовании.
- Не допускайте пересыхания стрипа в течение исследования (более 10 минут).
- Если при взбалтывании флакона с субстратным раствором в нем наблюдается наличие гетерогенных частиц, перед выполнением дальнейших процедур следует дождаться их осаждения. Эти частицы не влияют на качество результатов.

6. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты набора предназначены для диагностики *in vitro*.

- Не прикасайтесь к стрипам не защищенной рукой. Все манипуляции проводите с помощью пластиковых пинцетов.
- Используйте одноразовые перчатки при работе с реагентами и пробами.
- Используйте резиновую грушу для разлива жидкости с помощью пипетки.
- В материале человеческой природы, который использовался для приготовления отрицательной контрольной сыворотки (R3), в предварительных исследованиях было подтверждено отсутствие поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag), анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС антител.
- В материале человеческой природы, который использовался для приготовления положительной контрольной сыворотки (R4), в предварительных исследованиях было подтверждено отсутствие поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag) и анти-ВГС антител. Сыворотка инактивирована с использованием высокой температуры.

- Так как ни один из известных методов исследования не может полностью гарантировать отсутствие вирусов ВИЧ, ВГС и ВГВ, с реагентами и биологическими образцами следует обращаться как с потенциально инфицированным материалом.
- Любое оборудование, находившееся в непосредственном контакте с биологическими образцами и реагентами, также как и растворы промывки, должны рассматриваться как инфицированные и требуют соответствующего обращения.
- Избегайте разлива биологических проб и растворов, содержащих пробы.
- Контаминированная поверхность должна быть промыта от разлитой жидкости 10% раствором гипохлорида натрия. Если была разлита кислота, ее необходимо вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия и высушить промокательной бумагой. Материал, использованный для очистки поверхностей, следует выбрасывать в специальный контейнер для контаминированных отходов.
- Пробы и реагенты человеческого происхождения, также как и загрязненный материал, должны быть утилизированы после обработки:
 - или замачиванием в течение 30 минут в 5% растворе гипохлорида натрия (1 часть раствора на 10 частей загрязненной жидкости или воды);
 - или автоклавированием при 121°C минимум в течение 2-х часов. Автоклавирование – лучший метод инактивации ВИЧ и вируса гепатита В.

**ВНИМАНИЕ: НЕ ПОМЕЩАЙТЕ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ
ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ, В АВТОКЛАВ**

- Не забудьте нейтрализовать и/или автоклавировать растворы или моющие жидкости, содержащие биологические пробы, перед их сливом в канализацию.
- Химикаты требуют соответствующего обращения и должны быть утилизированы в соответствии с правилами Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices).
- Некоторые реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия может реагировать с лабораторными водопроводными системами с образованием азидов свинца и меди. Данные соединения взрывоопасны. Для предотвращения реакции образования азидов после выливания инактивированных растворов, содержащих азид, ополосните сливные трубы большим количеством воды.

7. НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С ДАННЫМ НАБОРОМ, МАТЕРИАЛЫ

- дистиллированная или деионизированная вода,
- градуированные цилиндры на 100, 250 и 500 мл,
- градуированные пипетки на 2 мл,
- автоматические или полуавтоматические пипетки с переменным или постоянным объемом для отбора 20 мкл жидкости,
- одноразовые перчатки,
- вакуумный насос с емкостью для биологических отходов,

- гипохлорит натрия (жавелевая вода),
- фильтровальная бумага,
- пинцеты,
- лабораторное перемешивающее устройство шейкер, обеспечивающий медленное горизонтальное, горизонтально-вертикальное или орбитальное покачивание платформы (медленное покачивание необходимо для сохранения гомогенности реакционной среды на этапе инкубации),
- контейнер для биологических отходов,
- защитные очки.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ И ИХ ХРАНЕНИЕ

Набор рассчитан на 18 определений, которые можно проводить отдельно.

РЕАГЕНТЫ, НЕ ТРЕБУЮЩИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ

R1: Нитроцеллюлозные стрипы

R3: Отрицательная контрольная сыворотка.

R4: Анти-ВИЧ1 положительная контрольная сыворотка.

R5: Конъюгат

R6: Субстратный раствор (BCIP/NBT)

РЕАГЕНТЫ, ТРЕБУЮЩИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ

R2: Промывочный раствор/растворитель (x 5)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ: Перед использованием встряхните флакон. Разведите промывочный раствор/растворитель дистиллированной водой в соотношении 1:5 (т.е. для полного лотка: 30 мл промывочного раствора + 120 мл дистиллированной воды). Перемешайте.

ХРАНЕНИЕ: Температура хранения набора + 2-8°C. При соблюдении температуры хранения + 2-8°C все реагенты вскрытого набора пригодны для использования до конца срока годности, указанного на коробке.

Разведенный промывающий раствор (R2) остается стабильным в течение 1 месяца при температуре хранения +2-8°C.

Избегайте бактериального загрязнения реагентов.

9. ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Отбор крови для исследования осуществляется согласно общим правилам. В качестве образца для исследования должна использоваться неразведенная сыворотка или плазма крови, собранной с ЭДТА, геларином, цитратом или антикоагулянтами на основе ACD.

Сыворотку или плазму от клеток крови следует отделять как можно скорее, чтобы избежать гемолиза. Обширный гемолиз может влиять на результаты анализа. Образцы, содержащие сгустки, следует перед проведением анализа очистить центрифугированием. Взвешенные частицы фибрина или агрегаты эритроцитов могут давать ложноположительные результаты.

Если исследование будет выполняться в течение 7 дней, образцы могут храниться при температуре +2-8°C. Если исследование будет выполняться через несколько месяцев, образцы следует хранить при глубокой заморозке – 20°C.

Образцы плазмы должны быть быстро разморожены нагреванием в течение нескольких минут до 40°C (чтобы ограничить преципитацию фибрина). Образцы нельзя подвергать процедуре замораживания-оттаивания многократно, после 3-х таких циклов исследовать сыворотку нельзя.

Если образцы необходимо транспортировать, их следует упаковать в соответствии с действующими правилами транспортировки инфицированного материала. НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕННУЮ, ГЕМОЛИЗИРОВАННУЮ СЫВОРОТКУ ИЛИ ПЛАЗМУ, А ТАКЖЕ МАТЕРИАЛ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ.

ВНИМАНИЕ: Образцы, содержащие альбумин до 90 г/л, билирубин 100 мг/л, липемические образцы, с содержанием липидов, эквивалентным менее 36 г/л олеина, а также гемолизированные пробы, с содержанием гемоглобина до 10 г/л могут быть исследованы с достоверным результатом.

10. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Перед началом исследования реагенты необходимо выдержать 30 минут при комнатной температуре (18-30°C) для их стабилизации.

Удалите упаковочную пленку, покрывающую используемый лоток.

Убедитесь, что стрипы лежат в ячейках той стороной вверх, на которой нанесена номерная маркировка и контрольная метка. Это необходимо, чтобы в процессе выполнения теста вирусные белки равномерно контактировали с реакционной средой.

Манипуляции со стрипами следует производить только с помощью пластиковых пинцетов.

Не позволяйте стрипам пересыхать при нахождении на воздухе более 10 минут.

Контрольные сыворотки в составе набора должны использоваться при каждой постановке параллельно с исследуемыми образцами для оценки корректности проведения анализа и для правильной оценки результатов.

2. Добавьте 2 мл разведенного промывочного раствора в каждую ячейку лотка со стрипами.
Инкубируйте 5 ± 1 минут при комнатной температуре (18-30°C), медленно покачивая лоток.
3. Добавьте по 20 мкл каждого образца или контрольных сывороток в соответствующие ячейки лотка.
Инкубируйте стрипы 2 часа ± 5 минут при комнатной температуре (18-30°C), медленно покачивая лоток.
4. Чтобы полностью удалить реакционную среду из ячеек лотка, используйте вакуумный насос с емкостью для биологических отходов, в которой находится дезинфектант (25% гипохлорит натрия).

Будьте внимательны, чтобы при аспирации содержимого ячеек не удалить Перед выполнением процедуры аспирации в каждой следующей ячейке тщательно промывайте насадку на шланге моющего устройства, которая контактирует с реакционной средой, чтобы избежать перекрестной контаминации образцов.

Промойте каждый стрип, для этого необходимо заполнить соответствующую ячейку лотка 2 мл разведенного промывочного раствора и немедленно его удалить с учетом мер предосторожности, указанных выше.

Промойте каждый стрип еще два раза: заполните каждую ячейку лотка 2 мл разведенного промывающего раствора, инкубируйте 5 минут при медленном покачивании, удалите раствор и повторите процедуру.

Всего должно быть выполнено 3 промывки. Удалите промывочный раствор после последней промывки.

5. Внесите по 2 мл конъюгата в каждую ячейку лотка. Конъюгат должен быть предварительно выдержан при комнатной температуре.

Инкубируйте 1 час $\pm$ 5 минут при комнатной температуре, медленно покачивая лоток.

6. Промойте стрипы в соответствии с пунктом 4.

7. Внесите по 2 мл субстратного раствора в каждую ячейку лотка. Если в растворе обнаруживаются гетерогенные частицы, перед выполнением данной процедуры дождитесь их осаждения. (Наличие частиц практически не влияет на результаты анализа).

Инкубируйте при медленном покачивании, наблюдая за развитием окрашивания. Все полосы, соответствующие вирусным белкам, должны проявляться на стрипе в ячейке с положительной контрольной сывороткой. (Время развития окраски – около 5 минут).

8. Остановка реакции осуществляется удалением субстратного раствора и промывкой стрипов не менее 3 раз дистиллированной водой.

9. Высушите стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги при комнатной температуре. Зафиксируйте стрипы на твердой подложке с помощью липкой ленты, ориентируя их по контрольной метке, и проводите интерпретацию.

ВНИМАНИЕ: Не приклеивайте липкую пленку к участкам стрипов с нанесенными вирусными белками.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подтверждение правильности результатов

ПОЛОСА, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИТЕЛА К IgG (ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ), ДОЛЖНА БЫТЬ ЯРКО ОКРАШЕННОЙ, ОТЧЕТЛИВО ВИДИМОЙ. ЭТО ДАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ УБЕДИТЬСЯ, ЧТО ВНЕСЕНИЕ СЫВОРОТКИ И РЕАГЕНТОВ, А ТАКЖЕ ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА БЫЛИ ВЫПОЛНЕНЫ ПРАВИЛЬНО. ОТСУТСТВИЕ ПОЛОСЫ АНТИ-IgG ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ ИЛИ НЕДОСТАТОЧНАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ЕЕ ОКРАСКИ УКАЗЫВАЕТ НА ОШИБКУ ПРИ ВНЕСЕНИИ ОБРАЗЦА ИЛИ РЕАГЕНТОВ ИЛИ НА ОШИБКИ В ВЫПОЛНЕНИИ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ: На стрипе с положительной контрольной сывороткой присутствуют полосы ко всем основным белкам ВИЧ1 (согласно схеме, стр. 13) и полоса внутреннего контроля.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ: На стрипе с отрицательной контрольной сывороткой полосы, соответствующие вирусным белкам отсутствуют. Присутствует только полоса внутреннего контроля.

Оценка полученных результатов

а) Белки вируса ВИЧ1

Присутствие антител к белковым компонентам ВИЧ 1 определяется по наличию на стрипах специфических окрашенных полос (фиолетово-голубые). Их расположение на стрипе соответствует молекулярной массе вирусных белков, перечисленных в таблице.

ВАЖНО:

Используйте положительный контроль для идентификации выявленных полос (см. схему). Проверяйте наличие полосы внутреннего контроля на каждом из анализируемых стрипов.

ОБОЗНАЧЕНИЕ	ГЕНОМ	ПРИРОДА	ВИД ПОЛОСЫ
GP 150	ENV	Гликопротеин - предшественник GP 110/120 и GP 41	Полоса с размытыми краями
GP 110/120	ENV	Гликопротеин оболочки	Полоса с размытыми краями
P 68/66	POL	Обратная транскриптаза	Четкая полоса
P 55	GAG	Предшественник ядерных белков	Двойная полоса
P 52/51	POL	Обратная транскриптаза	Четкая полоса
GP 41	ENV	Трансмембранный гликопротеин	Полоса с размытыми краями
P 40	GAG	Предшественник ядерных белков	Четкая полоса
P 34/31	POL	Эндонуклеаза	Четкая полоса
P 24/25	GAG	Ядерный белок	Четкая полоса
P 18/17	GAG	Ядерный белок	Иногда двойная полоса

Интерпретация

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ	КРИТЕРИИ ВОЗ*	КРИТЕРИИ CRSS**
Положительный	2 ENV + GAG ± POL	1 ENV - (1 GAG or 1 POL)
Неопределенный	1 ENV ± GAG ± POL GAG + POL GAG POL	GAG + POL GAG POL ENV
Отрицательный	Полосы отсутствуют Нет специфических полос	Полосы отсутствуют Нет специфических полос

* ВОЗ: Всемирная Организация Здравоохранения,

** CRSS: Консорциум по стандартизации исследования ретровирусов

Замечания

- Неопределенные результаты могут применяться в одном из следующих случаев: сероконверсия, инфекция ВИЧ 2, перекрестная реакция с другими ретровирусами.
- Контаминация исследуемого образца другой положительной сывороткой может вызывать положительный или неопределенный результат.

12 - ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследование специфичности на клинических образцах и донорском контингенте

419 отрицательных в ИФА образцов (214 проб донорской крови и 205 образцов пациентов) исследовали с помощью теста Нью Лав Блот I.

Полученные данные интерпретировали с помощью критериев BO3 и CRSS. Результаты интерпретации представлены в таблице. Существенного различия в количестве отрицательных результатов, полученных по критериям BO3 и CRSS не выявлено.

Тип образцов	Количество образцов	РЕЗУЛЬТАТЫ		
		Отрицательные	Неопределенные	Положительные
Доноры крови	214	180	34	0
Пациенты	205	186	19	0
Всего	419	366	53	0
		87%	13%	0%

Исследование специфичности на образцах с возможной интерференцией

57 образцов, продемонстрировавших в ИФА ВИЧ отрицательный результат, которые были определены как положительные по маркерам вирусных инфекций, включая ВГВ, ВГС, HPLV, ВПГ, ЭБВ, вирус ветряной оспы и ЦМВ или содержали анти-мышинные антитела, ревматоидный фактор, антинуклеарные антитела, а также 5 образцов от беременных женщин тестировались в Нью Лав Блот I.

ОБРАЗЦЫ (количество)	РЕЗУЛЬТАТЫ
миелома (5), ВГВ (4), IgG ВПГ (5)	Все отрицательные
анти-мышинные антитела (5)	1 неопределенный (p25)
ревматоидный фактор (5)	2 неопределенных (слабый p18)
АнА антинуклеарные антитела (5)	3 неопределенных (слабые p68, p55, p34)
беременные (5)	1 неопределенный (p52)
HPLV-вирус Т-лейкоза человека (4)	1 неопределенный (p55)
ВГС (4)	1 неопределенный (p55, p18)
IgG ЦМВ (5)	1 неопределенный (p25)
IgG ЭБВ (5)	2 неопределенных (p55, p25)
IgG против вируса ветряной оспы (5)	1 неопределенный (слабый p55)
IgG против антигенов токсоплазмы (5)	1 неопределенный (p18)

48 образцов были определены как отрицательные, зафиксировано 14 неопределенных результатов: 3 p25, 3 p18, 5 p55, 1 p52, 1 p34 и 1 p52. Ни один образец небы определен как положительный. Использование критериев BO3 или CRSS не влияло на результат.

Исследования чувствительности на ВИЧ-1 положительных образцах

203 положительных по ВИЧ-1 при исследовании в ИФА образца тестировались в диагностическом наборе Нью Лав Блот I. Среди указанных образцов было 5 ВИЧ группы О - 8 на стадии ранней инфекции (выявлена вирусная нагрузка или положительные по антигену) и 84 образца из разных стран таких как Китай, Индия, Нигерия. Результаты представлены в таблице.

		КРИТЕРИИ ВОЗ* 2 ENV ± GAG ± POL		КРИТЕРИИ CRSS** 1 ENV + (1 GAG or 1 POL)	
Образцы	Число образцов	Неопределен.	Положит.	Неопределен.	Положит.
Положит. ВИЧ	203	8	195	1	202
		4%	96%	0.5%	99.5%

* ВОЗ: Всемирная Организация Здравоохранения,

** CRSS: Консорциум по стандартизации исследования ретровирусов

Исследования чувствительности на ВИЧ-2 положительных образцах

На диагностическом наборе Нью Лав блот исследовались 101 ВИЧ-2 положительные образцы, из которых 6 образцов были положительными по ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в дискриминирующем тесте PERTI-LAV

		КРИТЕРИИ ВОЗ* 2 ENV ± GAG ± POL		КРИТЕРИИ CRSS** 1 ENV + (1 GAG or 1 POL)	
Образцы	Число образцов	Неопределен.	Положит.	Неопределен.	Положит.
Положит. ВИЧ	101	56	45	23	78
		56%	45%	23%	78%

* ВОЗ: Всемирная Организация Здравоохранения,

** CRSS: Консорциум по стандартизации исследования ретровирусов

Исследование чувствительности на сероконверсионных панелях

Исследовали 55 образцов из 17 сероконверсионных панелей (BBI, NABI и BCP), а также 10 образцов от 4 пациентов на стадии сероконверсии, всего 21 сероконверсионная панель.

		КРИТЕРИИ ВОЗ* 2 ENV ± GAG ± POL			КРИТЕРИИ CRSS** 1 ENV + (1 GAG или 1 POL)		
Образцы		Положит.	Неопределен.	Отрицат.	Положит.	Неопределен.	Отрицат.
65	2	46	17	37	11	17	
	3%	71%	26%	57%	17%	26%	

* ВОЗ: Всемирная Организация Здравоохранения,

** CRSS: Консорциум по стандартизации исследований ретровирусов.

Таким образом, использование критериев CRSS в значительной степени увеличивает чувствительность теста, сокращая число неопределенных образцов, определяя большее число образцов как положительные.

Воспроизводимость

• **Воспроизводимость внутри постановки**

Один отрицательный по ВИЧ образец и 3 разведенных положительных (2 слабоположительных и 1 положительный) исследовали в 6 повторах в одной постановке. Интерпретацию результатов проводили с использованием обоих критериев (ВОЗ и CRSS). Результаты исследования не зависели от системы критериев интерпретации (ВОЗ или CRSS).

• **Воспроизводимость между постановками**

Один отрицательный по ВИЧ образец, 6 разведенных положительных (3 слабоположительных и 3 положительных) и 3 сильно положительных образца исследовали в течение 5 дней в независимых постановках. Интерпретацию результатов проводили с использованием обоих критериев. Результаты исследования не зависели от системы критериев интерпретации (ВОЗ или CRSS).

13 - ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Вариабельность вирусов ВИЧ 1 (группы М и группы О) и ВИЧ 2 не позволяет исключить возможность ложноотрицательных результатов. Ни один из существующих в настоящий момент лабораторных тестов не может дать основание полностью исключить присутствие ВИЧ-инфекции.
- Отрицательный результат в подтверждающем тесте при положительном результате в скрининговом тесте может свидетельствовать о ранней стадии инфекции, следовательно полученный результат демонстрирует отсутствие антител, которые могут быть определены с помощью Нью Лав Блот I. В этом случае нельзя полностью исключить наличие развивающейся ВИЧ 1 / ВИЧ 2 инфекции. Рекомендуется повторно, спустя некоторое время, исследовать еще один образец, взятый у этого пациента.
- Наличие одиночной полосы ENV, при которой образец в тесте Нью Лав Блот I интерпретируется, согласно критериям CRSS, как положительный, не исключает возможности выявления ВИЧ-2 инфекции.
- При оценке результата как "неопределенный" нельзя исключить одну из трех ситуаций: сероконверсии, ВИЧ 2 или перекрестной реакции при наличии других ретровирусов.
- Атипичный профиль со слабой полосой в области протеинов оболочки (ENV: gp120/gp160) и выраженным присутствием полос в области GAG и POL протеинов дает основание предположить возможность инфекции ВИЧ-2 или ВИЧ 1 группы О. Необходимо дополнительное исследование.

14 - ЛИТЕРАТУРА

См. французскую версию.

NEW LAV-BLOT II НЬЮ ЛАВ БЛОТ 2

18 определений

72252 R

**ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ
БЕЛКАМ ВИЧ 2 ТИПА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА**

IVD

Для диагностики in vitro

Контроль качества производителем

Качество всех произведенных и предназначенных для продажи реагентов находится под всесторонним контролем качества, начиная с получения сырья и до продажи продукта пользователю.

Каждая серия проходит контроль качества и поступает на рынок лишь при соответствии заданным критериям. Документы о производстве и контроле каждой серии хранятся в компании **БИО-РАД (BIO-RAD)**.

Адрес представительства в России:

125167 Москва Ленинградский пр-т, 37А, стр. 14

Тел.: (495) 721 14 04, Факс: (495) 721 14 12, e-mail: post@bio-rad.ru

BIO-RAD

СОДЕРЖАНИЕ

- 1. ПРИМЕНЕНИЕ**
- 2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**
- 3. ПРИНЦИП МЕТОДА**
- 4. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА**
- 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
- 6. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ**
- 7. НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ
С ДАННЫМ НАБОРОМ, МАТЕРИАЛЫ**
- 8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ
И ИХ ХРАНЕНИЕ**
- 9. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**
- 10. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**
- 11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**
- 12. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**
- 13. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА**
- 14. ЛИТЕРАТУРА**

1. ПРИМЕНЕНИЕ

Нью Лав Блот 2 (NEW LAV-BLOT II) – набор, предназначенный для выявления анти-ВИЧ2 антител в сыворотке или плазме крови человека методом иммуно-блоттинга с целью подтверждения положительного ответа на наличие антител к ВИЧ2 и характеристики антигенной специфичности при диагностике СПИДа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) был описан и определен как заболевание с характерным комплексом симптомов в 1981 году. Из лимфоцитов больных СПИДом как на стадии проявления клинических признаков, так и в продромальный период были выделены три ретровируса (LAV, HTLV III, ARV), которые относятся к группе лентивирусов и не дифференцируются обычными серологическими тестами. В 1986 году было принято решение объединить эти три вируса под одним общим термином – "вирус иммунодефицита человека" (ВИЧ). В 1986 году у пациентов из Южной Африки, болеющих СПИДом, был выделен новый ретровирус (LAV-2/ВИЧ-2). Этот вирус сходен с ВИЧ-1 благодаря его морфологии, тропизму и цитопатогенетическому действию на Т4-лимфоциты. Генетический анализ показал, что этот вирус отличался от ВИЧ-1 строением оболочки и имел филогенетическое сходство с STLV III. С другой стороны, серологические исследования показали, что во многих случаях имело место одновременное узнавание ядерных белков ВИЧ-1 и ВИЧ-2 антителами пациентов. Однако, в некоторых сыворотках ВИЧ-1 не был обнаружен.

Скрининговые исследования основаны на выявлении антител в сыворотке или плазме с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА). Качество антигенов, используемых в этих ИФА тест-системах, не позволяет полностью исключить неспецифический результат. Учитывая тяжесть диагноза, необходимо осуществлять подтверждение или опровержение результатов скрининга с использованием других методик. Эксперты ВОЗ рекомендуют для этого использовать метод иммуноблоттинга (Western Blot).

Этот метод позволяет дифференциально выявлять антитела против каждого белка вируса, и, следовательно, подтвердить серопозитивность образца или выявить возможные неспецифические реакции. При диагностике СПИДа становится необходимым охарактеризовать тип инфекции (ВИЧ-1 или ВИЧ-2).

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на принципе непрямого ИФА, выполняемого на нитроцеллюлозной мембране-стрипе, содержащей все белки ВИЧ2 вируса и полосу внутреннего контроля, содержащую антитела к IgG. Полоса, соответствующая внутреннему контролю теста, расположена в нижней части нитроцеллюлозной мембраны с противоположной от маркировки стороны, перед полосой соответствующей белку р16. Данная полоса служит для определения правильности внесения образца и реагентов, а также правильности выполнения протокола исследования.

Инактивированные белки вируса ВИЧ2 разделяются по молекулярному весу методом электрофореза в полиакриламидном геле в диссоциирующей и восстанавливающей среде и в последующем переносятся на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса.

Методика включает следующие этапы:

1. Регидратация стрипов.
2. Инкубирование стрипа и подтверждаемых образцов или контрольных сывороток.
Антитела к ВИЧ1, при их наличии в образце, связываются с белками вируса, перенесенными на стрип.
3. После промывки добавляют антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой и инкубируют. Конъюгат взаимодействует с антителами к ВИЧ1, связавшимися с твердой фазой подложки.
4. После промывки и удаления избытка конъюгата, комплексы, связанные с нитроцеллюлозной мембраной, окрашиваются в результате ферментативной реакции конъюгата и раствора субстрата.
5. Появление специфически окрашенных полос на мембране позволяет регистрировать наличие антител к ВИЧ 1 в образце.

4. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Все реагенты набора предназначены для диагностики in vitro.

Набор рассчитан на 18 определений, которые можно проводить отдельно.

Метка	Реагент	Форма выпуска
R1	Нитроцеллюлозные стрипы ВИЧ2 Нанесены белки вируса ВИЧ2 и внутренний анти-IgG контроль. Стрипы помещены в одноразовые лотки.	18 стрипов в 3 лотках (по 6 стрипов в каждом лотке)
R2	Промывочный раствор/ растворитель (x 5) Концентрированный 5х Содержит 0,5% хлороформ	1 флакон 100 мл
R3	Отрицательная контрольная сыворотка. Сыворотка человека, не содержащая антитела к ВИЧ, антитела к ВГС и антиген HBs. Консервант: < 0,1% азид натрия	1 флакон 0,2 мл
R4	Анти-ВИЧ2 положительная контрольная сыворотка. Сыворотка человека, содержащая антитела к ВИЧ2 и не содержащая антитела к ВГС и антиген HBs, инактивированная нагреванием. Консервант: < 0,1% азид натрия	1 флакон 0,2 мл
R5	Конъюгат Козьи антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой. Консервант: 0,1% азид натрия	1 флакон 40 мл
R6	Субстратный раствор (BCIP/NBT) 5Бром-4Хлор-3-Индолил-Фосфат (BCIP) и нитро-тетразолин синий (NBT), содержащийся в растворе как цветовой индикатор реакции	1 флакон 40 мл

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices):

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте реагенты из различных партий при выполнении определенного теста.

Примечание: Для проведения теста промывочный раствор (маркировка R2, синего цвета) и субстратный раствор (R6) можно с ограничениями использовать из другой, близкой по дате выпуска партии. Обратитесь в нашу службу поддержки пользователей за детальной информацией.

- Перед использованием необходимо выдержать реагенты 30 минут для их стабилизации при комнатной температуре (18-30°C).
- Аккуратно разведите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Не проводите тест в присутствии паров реактивов (пары кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут изменять ферментативную активность конъюгатов.
- Используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую деионизированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду.
- Используйте новый наконечник для внесения каждой пробы.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для конъюгата и субстратного раствора.
- Не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.
- Используйте пипетки и оборудование, прошедшие метрологическую поверку.
- Не изменяйте протокол исследования.
- Контрольные сыворотки должны использоваться параллельно с исследуемыми образцами в каждом исследовании.
- Не допускайте пересыхания стрипа в течение исследования (более 10 минут).
- Если при взбалтывании флакона с субстратным раствором в нем наблюдается наличие гетерогенных частиц, перед выполнением дальнейших процедур следует дождаться их осаждения. Эти частицы не влияют на качество результатов.

6. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты набора предназначены для диагностики *in vitro*.

- Не прикасайтесь к стрипам не защищенной рукой. Все манипуляции проводите с помощью пластиковых пинцетов.
- Используйте одноразовые перчатки при работе с реагентами и пробами.
- Используйте резиновую грушу для разлива жидкости с помощью пипетки.
- В материале человеческой природы, который использовался для приготовления отрицательной контрольной сыворотки (R3), в предварительных исследованиях было подтверждено отсутствие поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag), анти-ВИЧ1, анти-ВИЧ2 и анти-ВГС антител.

- В материале человеческой природы, который использовался для приготовления положительной контрольной сыворотки (R4), в предварительных исследованиях было подтверждено отсутствие поверхностного антигена гепатита В (HBs AG) и анти-ВГС антител. Сыворотка инактивирована с использованием высокой температуры.
- Так как ни один из известных методов исследования не может полностью гарантировать отсутствие вирусов ВИЧ, ВГС и ВГВ, с реагентами и биологическими образцами следует обращаться как с потенциально инфицированным материалом.
- Любое оборудование, находившееся в непосредственном контакте с биологическими образцами и реагентами, также как и растворы промывки, должны рассматриваться как инфицированные и требуют соответствующего обращения.
- Избегайте разлива биологических проб и растворов, содержащих пробы.
- Контаминированная поверхность должна быть промыта от разлитой жидкости 10% раствором гипохлорида натрия. Если была разлита кислота, ее необходимо вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия и высушить промокатальной бумагой. Материал, использованный для очистки поверхностей, следует выбрасывать в специальный контейнер для контаминированных отходов.
- Пробы и реагенты человеческого происхождения, также как и загрязненный материал, должны быть утилизированы после обработки:
 - или замачиванием в течение 30 минут в 5% растворе гипохлорида натрия (1 часть раствора на 10 частей загрязненной жидкости или воды);
 - или автоклавированием при 121°C минимум в течение 2-х часов. Автоклавирование – лучший метод инактивации ВИЧ и вируса гепатита В.

**ВНИМАНИЕ: НЕ ПОМЕЩАЙТЕ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ
ГИПОХЛОРИД НАТРИЯ, В АВТОКЛАВ**

- Не забудьте нейтрализовать и/или автоклавировать растворы или моющие жидкости, содержащие биологические пробы, перед их сливом в канализацию.
- Химикаты требуют соответствующего обращения и должны быть утилизированы в соответствии с правилами Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practices).
- Некоторые реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия может реагировать с лабораторными водопроводными системами с образованием азидов свинца и меди. Данные соединения взрывоопасны. Для предотвращения реакции образования азидов после выливания инактивированных растворов, содержащих азид, ополосните сливные трубы большим количеством воды.

7. НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С ДАННЫМ НАБОРОМ, МАТЕРИАЛЫ

- дистиллированная или деионизированная вода,
- градуированные цилиндры на 100, 250 и 500 мл.

- градуированные пипетки на 2 мл,
- автоматические или полуавтоматические пипетки с переменным или постоянным объемом для отбора 20 мкл жидкости,
- одноразовые перчатки,
- вакуумный насос с емкостью для биологических отходов,
- гипохлорит натрия (жавелевая вода),
- фильтровальная бумага,
- пинцеты,
- лабораторное перемешивающее устройство шейкер, обеспечивающий медленное горизонтальное, горизонтально-вертикальное или орбитальное покачивание платформы (медленное покачивание необходимо для сохранения гомогенности реакционной среды на этапе инкубации),
- контейнер для биологических отходов,
- защитные очки.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К АНАЛИЗУ И ИХ ХРАНЕНИЕ

Набор рассчитан на 18 определений, которые можно проводить отдельно.

РЕАГЕНТЫ, НЕ ТРЕБУЮЩИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ

R1: Нитроцеллюлозные стрипы

R3: Отрицательная контрольная сыворотка.

R4: Анти-ВИЧ2 положительная контрольная сыворотка.

R5: Конъюгат

R6: Субстратный раствор (BCIP/NBT)

РЕАГЕНТЫ, ТРЕБУЮЩИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ

R2: Промывочный раствор/растворитель (x 5)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ: Перед использованием встряхните флакон. Разведите промывочный раствор/растворитель дистиллированной водой в соотношении 1:5 (т.е. для полного лотка: 30 мл промывочного раствора + 120 мл дистиллированной воды). Перемешайте.

ХРАНЕНИЕ: Температура хранения набора +2-8°C. При соблюдении температуры хранения +2-8°C все реагенты вскрытого набора пригодны для использования до конца срока годности, указанного на коробке.

Разведенный промывающий раствор (R2) остается стабильным в течение 1 месяца при температуре хранения +2-8°C.

Избегайте бактериального загрязнения реагентов.

9. ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Отбор крови для исследования осуществляется согласно общим правилам. В качестве образца для исследования должна использоваться неразведенная сыворотка или плазма крови (собранной с ЭДТА, гепарином, или цитратом)

Сыворотку или плазму от клеток крови следует отделять как можно скорее, чтобы избежать гемолиза. Обширный гемолиз может влиять на результаты анализа. Образцы, содержащие сгустки, следует перед проведением анализа очистить центрифугированием. Взвешенные частицы фибрина или агрегаты эритроцитов могут давать ложноположительные результаты.

Если исследование будет выполняться в течение 7 дней, образцы могут храниться при температуре +2-8°C. Если исследование будет выполняться через несколько месяцев, образцы следует хранить при глубокой заморозке – 20°C.

Образцы плазмы должны быть быстро разморожены нагреванием в течение нескольких минут до 40°C (чтобы ограничить преципитацию фибрина). Образцы нельзя подвергать процедуре замораживания-оттаивания многократно, после 3-х таких циклов исследовать сыворотку нельзя.

Если образцы необходимо транспортировать, их следует упаковать в соответствии с действующими правилами транспортировки инфицированного материала. НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕННУЮ, ГЕМОЛИЗИРОВАННУЮ СЫВОРОТКУ ИЛИ ПЛАЗМУ, А ТАКЖЕ МАТЕРИАЛ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ.

ВНИМАНИЕ: Образцы, содержащие альбумин до 90 г/л, билирубин 100 мг/л, липемические образцы, с содержанием липидов, эквивалентным менее 36 г/л олеина, а также гемолизированные пробы, с содержанием гемоглобина до 10 г/л могут быть исследованы с достоверным результатом.

10. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Перед началом исследования реагенты необходимо выдержать 30 минут при комнатной температуре (18-30°C) для их стабилизации.

Удалите упаковочную пленку, покрывающую используемый лоток.

Убедитесь, что стрипы лежат в ячейках той стороной вверх, на которой нанесена номерная маркировка и контрольная метка. Это необходимо, чтобы в процессе выполнения теста вирусные белки равномерно контактировали с реакционной средой.

Манипуляции со стрипами следует производить только с помощью пластиковых пинцетов.

Не позволяйте стрипам пересыхать при нахождении на воздухе более 10 минут.

Контрольные сыворотки в составе набора должны использоваться при каждой постановке параллельно с исследуемыми образцами для оценки корректности проведения анализа и для правильной оценки результатов.

2. Добавьте 2 мл разведенного промывочного раствора в каждую ячейку лотка со стрипами.

Инкубируйте 5 ± 1 минут при комнатной температуре (18-30°C), медленно покачивая лоток.

Б-
З-
И-
Т-

В-
СЗ
ИВ
З-
Ю-

Л-
Л-
Н-
О-

Л,
ЛМ
Р-
О-

Р-
ЛТ

К-

СВ
ПВ
КМ

3. Добавьте по 20 мкл каждого образца или контрольных сывороток в соответствующие ячейки лотка.
Инкубируйте стрипы 2 часа $\pm$ 5 минут при комнатной температуре (18-30°C), медленно покачивая лоток.
4. Чтобы полностью удалить реакционную среду из ячеек лотка, используйте вакуумный насос с емкостью для биологических отходов, в которой находится дезинфектант (25% гипохлорит натрия). Будьте внимательны, чтобы при аспирации содержимого ячеек не удалить стрипы. Перед выполнением процедуры аспирации в каждой следующей ячейке тщательно промывайте насадку на шланге моющего устройства, которая контактирует с реакционной средой, чтобы избежать перекрестной контаминации образцов.
Промойте каждый стрип, для этого необходимо заполнить соответствующую ячейку лотка 2 мл разведенного промывочного раствора и немедленно его удалить с учетом мер предосторожности, указанных выше. Промойте каждый стрип еще два раза: наполните каждую ячейку лотка 2 мл разведенного промывающего раствора, инкубируйте 5 минут при медленном покачивании, удалите раствор и повторите процедуру. Всего должно быть выполнено 3 промывки. Удалите промывочный раствор после последней промывки.
5. Внесите по 2 мл конъюгата в каждую ячейку лотка. Конъюгат должен быть предварительно выдержан при комнатной температуре.
Инкубируйте 1 час $\pm$ 5 минут при комнатной температуре (18-30°C), медленно покачивая лоток.
6. Промойте стрипы в соответствии с пунктом 4.
7. Внесите по 2 мл субстратного раствора в каждую ячейку лотка. Если в растворе обнаруживаются гетерогенные частицы, перед выполнением данной процедуры дождитесь их осаждения. (Наличие частиц практически не влияет на результаты анализа).
Инкубируйте при медленном покачивании, наблюдая за развитием окрашивания. Все полосы, соответствующие вирусным белкам, должны проявляться на стрипе в ячейке с положительной контрольной сывороткой. (Время развития окраски – около 5 минут).
8. Остановка реакции осуществляется удалением субстратного раствора и промывкой стрипов не менее 3 раз дистиллированной водой.
9. Высушите стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги при комнатной температуре (18-30°C).
Зафиксируйте стрипы на твердой подложке с помощью липкой ленты, ориентируя их по контрольной метке, и проводите интерпретацию.

ВНИМАНИЕ: Не приклеивайте липкую пленку к участкам стрипов с нанесенными вирусными белками.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подтверждение правильности результатов

ПОЛОСА, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИТЕЛА К IgG (ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ), ДОЛЖНА БЫТЬ ЯРКО ОКРАШЕННОЙ, ОТЧЕТЛИВО ВИДИМОЙ. ЭТО ДАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ УБЕДИТЬСЯ, ЧТО ВНЕСЕНИЕ СЫВОРОТКИ И РЕАГЕНТОВ, А ТАКЖЕ ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА БЫЛИ ВЫПОЛНЕНЫ ПРАВИЛЬНО. ОТСУТСТВИЕ ПОЛОСЫ АНТИ-IgG ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ ИЛИ НЕДОСТАТОЧНАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ЕЕ ОКРАСКИ УКАЗЫВАЕТ НА ОШИБКУ ПРИ ВНЕСЕНИИ ОБРАЗЦА ИЛИ РЕАГЕНТОВ ИЛИ НА ОШИБКИ В ВЫПОЛНЕНИИ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ: На стрипе с положительной контрольной сывороткой присутствуют полосы ко всем основным белкам ВИЧ1 (согласно схеме, стр. 13) и полоса внутреннего контроля.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ: На стрипе с отрицательной контрольной сывороткой полосы, соответствующие вирусным белкам отсутствуют. Присутствует только полоса внутреннего контроля.

Оценка полученных результатов

Присутствие антител к белковым компонентам ВИЧ 2 определяется по наличию на стрипах специфических окрашенных полос (фиолетово-голубые). Их расположение на стрипе соответствует молекулярной массе вирусных белков, перечисленных в таблице.

Используйте положительный контроль для идентификации выявленных полос (см. схему). Проверяйте наличие полосы внутреннего контроля на каждом из анализируемых стрипов.

ОБОЗНАЧЕНИЕ	ГЕНОМ	ПРИРОДА	ВИД ПОЛОСЫ
GP 140	ENV	Гликопротеин - Предшественник GP105 и GP35	± Полоса с размытыми краями
GP 105/125	ENV	Гликопротеин оболочки	Полоса с размытыми краями
P 58	POL	Обратная транскриптаза	Четкая полоса
P 56	GAG	Предшественник ядерных белков	Четкая полоса
GP 36	ENV	Трансмембранный гликопротеин	Полоса с размытыми краями
P 34	POL	Эндонуклеаза	Четкая полоса
P 26	GAG	Ядерный белок	Четкая полоса
P 16	GAG	Ядерный белок	Четкая полоса

* Полоса p34 - четкая полоса, которая может определяться в той же позиции, что и полоса с размытыми краями GP36

),
ЭТ
А
Г-
Я
И
А

И
Ю

А-
Г-

1-
IX
Э,

3-



Интерпретация

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ	КРИТЕРИИ
Положительный	ENV + GAG + POL
Неопределенный	ENV + GAG
	ENV + POL
	GAG + POL
	GAG
	POL
Отрицательный	ENV
	Нет специфических полос Полосы отсутствуют

ЗАМЕЧАНИЕ

- Положительный или неопределенный результат может быть получен при исследовании образца, контаминированного другой положительной сывороткой.
- Возможно использование других критериев интерпретации. В Германии рекомендовано использование критериев Немецкой ассоциации борьбы с вирусными заболеваниями (DMV): **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ** - представлена хотя бы одна полоса Env и полоса Gag или Pol; **НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ** - любой набор полос, не удовлетворяющий представленному выше критерию. **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ** - отсутствие полос. Полосы gp 105/125/140 при использовании данного критерия считают одним белком.

12. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Специфичность теста НЬЮ ЛАВ БЛОТ 2 (НЛБ 2) была исследована на образцах донорской крови (196) и госпитализированных пациентов (201). Также тестировались образцы, не реактивные по анти-ВИЧ антителам в ИФА тесте, но содержащие маркеры других инфекционных заболеваний, таких как краснуха, токсоплазма, бактериальная пневмония, гепатиты А, В, С. Исследовали образцы, взятые у беременных женщин, пробы, содержащие ревматоидный фактор и 39 образцов, которые демонстрировали в ИФА тестах предположительно ложно-положительный результат. Таким образом было исследовано 119 образцов с потенциальной интерференцией. Все результаты были интерпретированы с использованием критериев, приведенных в таблице данной инструкции.

Ни один из 516 исследованных образцов не продемонстрировал положительный результат в тесте НЛБ 2.

При исследовании 204 образцов, реактивных по анти-ВИЧ антителам в ИФА тесте и характеризующихся как, содержащие анти-ВИЧ 2 антитела в детерминирующем тесте (ИФА, блот) было выявлено следующее: в 202 случаях результат был подтвержден в тесте НЛБ 2 и 2 образца были определены как неопределенные.

Для 41 образца, реактивного по анти-ВИЧ1 и ВИЧ2 антителам, результат был подтвержден в тесте НЛБ 2.

При исследованиях панели из 131 анти-ВИЧ 1 положительного образца, 110 образцов были определены в тесте НЛБ 2 как неопределенные и 21 образец как положительный.

Исследование воспроизводимости результатов как внутри одной постановки, так и между постановками не выявило различия результатов постановками.

13. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Для достижения оптимальных характеристик тестирования необходимо строго следовать описанию процедуры анализа.
- Положительный контрольный образец должен быть исследован параллельно с клиническими пробами в каждой постановке теста. Это необходимо как для валидации результатов тестирования, так и для правильной интерпретации выявляемых полос.
- Отрицательный результат подтверждающего теста при наличии положительного результата в скрининговом тесте может наблюдаться в течение ранних стадий инфекции, также отрицательные результаты тестирования указывают на то, что исследуемый образец не содержит анти-ВИЧ антитела, определяемые в тест-системе НЬЮ ЛАВ БЛОТ 2. Однако, такой результат не позволяет полностью исключить наличие ВИЧ1/ВИЧ2 инфекции.
Рекомендуется повторить исследование на образцах, взятых в более поздние сроки.
- Вариабельность вирусов ВИЧ1 и ВИЧ2 не позволяет исключить возможность ложно-отрицательных результатов. Ни один из существующих лабораторных тестов не может дать основание полностью исключить присутствие ВИЧ инфекции.
- Использование менее строгих критериев интерпретации может вызывать различия в классификации образцов. Образцы, которые были определены как неопределенные в соответствии с критериями, приведенными в данной инструкции, могут быть признаны реактивными согласно другим критериям интерпретации.
- Неопределенный результат не исключает одного из следующих вариантов: сероконверсии, ВИЧ1 или перекрестная реакция, связанная с другими ретровирусами.

14. ЛИТЕРАТУРА

Открыть версия

Пример профиля положительного контрольного образца R4

CAUTION : precise bands may differ in reality. Don't use this picture for final interpretation. Use the positive control strip to verify the patient antibodies and check that the internal control band is present on each strip.

ВНИМАНИЕ:

В реальном опыте точное расположение полос может отличаться от представленного на рисунке. Не используйте рисунок для конечной интерпретации результатов. Для идентификации полос, соответствующих антителам сыворотки пациента, используйте стрип с положительной контрольной сывороткой, проверяя наличие полос внутреннего контроля на каждом стрипе.

