

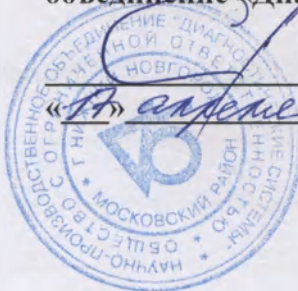


«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»

О.Н. Шлюндин

2015 г.



REF



Code: 1.0.RU

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«МилаБлот-ВИЧ»
Тест-система иммуноферментная
для выявления антител к индивидуальным белкам
вируса иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2)
методом линейного иммуноблота,
набор диагностический

СОДЕРЖАНИЕ

I. НАЗНАЧЕНИЕ	3
II. ПРИНЦИП МЕТОДА	3
III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «МилаБлот-ВИЧ»	3
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ	6
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ	6
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	6
IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ	6
X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ	8
XII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА	10
XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	10
XIV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	10
XV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ	11
Приложение 1	12

Набор реагентов выпускается в 3 комплектах:

Комплект 1 рассчитан на проведение 18 определений, включая контрольные, предназначен для ручной и автоматической постановки с возможностью дробного (3×6) использования набора.

Комплект 2 рассчитан на проведение 24 определений, включая контрольные, предназначен для ручной и автоматической постановки с возможностью дробного (3×8) использования набора.

Комплект 3 рассчитан на проведение 36 определений, включая контрольные, предназначен для ручной и автоматической постановки с возможностью дробного (3×12) использования набора.

Все комплекты набора реагентов эквивалентны по назначению, свойствам и функциональным характеристикам (аналитическая и диагностическая чувствительность и специфичность).

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «МилаБлот-ВИЧ» предназначен для выявления антител к индивидуальным белкам ВИЧ 1 и 2 типов в сыворотке или плазме крови человека методом иммунного блоттинга (линейный иммуноблот) с целью подтверждения положительного результата на наличие анти-ВИЧ антител и определения профиля антител при диагностике ВИЧ/СПИД.

Клиническое назначение.

Основным методом выявления ВИЧ-инфекции является тестирование с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для подтверждения положительных результатов ИФА используют метод иммунного блоттинга.

Этот метод позволяет выявить антитела к ВИЧ-1 или к ВИЧ-2 в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови человека за счёт взаимодействия с антигенами ВИЧ 1 типа (env1: gp160, gp120; gp41; gp41 гр.О; pol: p31, p66/p51; gag: 24, 17), или ВИЧ 2 типа (env2: gp36, gp105), нанесенными на тест-стрип, и таким образом подтвердить серопозитивность образца или выявить возможные неспецифические реакции.

Набор «МилаБлот-ВИЧ» содержит все необходимые реагенты для подтверждения положительных результатов ИФА и определения профиля антител к антигенам ВИЧ методом иммунного блоттинга.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

В основе теста лежит метод непрямого иммуноферментного анализа. На тест-стрип нанесены в виде отдельных линий рекомбинантные белки, содержащие антигенные детерминанты ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

На каждый тест-стрип также нанесены 4 контрольные линии:

- 1 - cut off;
- 2 - контроль внесения конъюгата;
- 3 - контроль внесения образца;
- 4 - контроль специфичности.

Контрольные линии располагаются в нижней части тест-стрипа.

Методика включает следующие этапы:

1. Инкубация тест-стрипа с тестируемыми или контрольными образцами. Если в образце содержатся антитела к ВИЧ, они будут связываться с антигенами на тест-стрипе.
2. Инкубация тест-стрипа с конъюгатом. Конъюгат взаимодействует с комплексом ВИЧ-антиген/антитело, который сформировался на тест-стрипе на первой стадии.
3. При инкубации с хромоген-субстратным раствором на контрольных линиях и на тех линиях, где присутствует комплекс со специфическими антителами ВИЧ, наблюдается окрашивание. Для остановки реакции тест-стрипы промываются дистиллированной водой.
4. В случае если тестируемый образец не содержит антител к ВИЧ, наблюдается связывание только с контрольными линиями 1, 2, 3 (cut off, контроль внесения конъюгата и сыворотки) на тест-стрипе. Контроль специфичности реакции (линия 4) должен быть отрицательным во всех случаях.

III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «МилаБлот-ВИЧ»

3.1. Состав набора:

Таблица 1

Характеристики реагентов		Форма выпуска		
		Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3
Иммуносорбент	Промаркированные тест-стрипы с нанесенными рекомбинантными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и контрольными линиями, упакованы в контейнер с силикагелем.	1 контейнер 18 стрипов	1 контейнер 24 стрипа	1 контейнер 36 стрипов
K+	Контрольный положительный образец, инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 0,3 мл	1 флакон 0,3 мл	1 флакон 0,3 мл

	Контрольный отрицательный образец, инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 0,3 мл	1 флакон 0,3 мл	1 флакон 0,3 мл
Реагент 1	Буферный раствор для разведения образцов и приготовления промывочного раствора (ПР), содержит детергент, стабилизаторы белков. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 120,0 мл	2 флакона по 120,0 мл
Реагент 2	Конъюгат (анти-human антитела, меченые пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). Прозрачная или слегка опалесцирующая от оранжевого до красного цвета жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл
Реагент 3	Субстратный раствор, содержащий ГМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) или BCIP/NBT(5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат/нитротетразол голубой). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, допускается жёлто-зелёный оттенок.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл

Объемы реагентов указаны на этикетках флаконов.

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется маркировка посредством штрих-кодов. Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

3.2. Принадлежности.

Трафарет-схема (для идентификации окрашенных линий на тест-стрипах после проведения анализа), форма для учета результатов, лотки для инкубации тест-стрипов, защитная пленка к лоткам, пинцет пластиковый. Принадлежности могут быть дополнительно включены в комплект поставки.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность набора реагентов «МилаБлот-ВИЧ» оценивалась при тестировании:

- Образцов сыворотки крови от 200 пациентов, инфицированных ВИЧ-1 - все образцы выявлены как ВИЧ-1 положительные.
- Образцов плазмы крови от 7 пациентов, инфицированных ВИЧ-2 - все образцы выявлены как ВИЧ-2 положительные.
- Образцов плазмы крови от 3 пациентов, инфицированных ВИЧ-1 группы О - все образцы выявлены как ВИЧ-1 положительные.

Чувствительность при тестировании ВИЧ позитивных образцов составила 100% (210 положительных результатов из 210 положительных образцов). Границы доверительного интервала (CI) при доверительной вероятности 95%: от 98.2% до 100%. Ложноотрицательных результатов 0% (0 отрицательных результатов из 210 позитивных образцов).

Диагностическая чувствительность набора также оценена на 10 коммерческих сероконверсионных панелях (ZeptoMetrix, VBI, CIAA). Результаты представлены в таблице 2:

Таблица 2

Диагностическая чувствительность набора реагентов «МилаБлот-ВИЧ»
при исследовании сероконверсионных панелей

Панель	Количество позитивных результатов по сравнению с количеством протестированных образцов	
	«МилаБлот-ВИЧ»	Тест сравнения
ZMC HIV9014	5/7	5/7
ZMC HIV9017	2/6	1/6
ZMC HIV9032	6/14	5/14
ZMC HIV6247	0/10	0/10
ZMC HIV9018	1/11	0/11
ZMC HIV6243	1/10	0/10
PRB HIV926	2/6	2/6
PRB HIV940	5/8	5/8
PRB HIV965	1/6	1/6
PRB HIV966	1/10	0/10
Итого	24/88	19/88

Специфичность

Оценка специфичности проведена на случайной выборке образцов сыворотки крови доноров, беременных и соматических больных в количестве 288 образцов - все образцы выявлены как отрицательные.

Специфичность при тестировании случайной выборки образцов сыворотки крови доноров, беременных и соматических больных составила 100% (288 отрицательных результатов из 288 отрицательных образцов) (95% CI: 98.68% до 100%). Ложноположительных результатов 0% (0 положительных результатов из 288 отрицательных образцов).

При тестировании стандартной панели сывороток «Стандарт ВИЧ-1,2 АТ(-), ВИЧ-1 АГ р24(-)», НПО «Диагностические системы», представляющего собой набор сывороток крови человека, не содержащих антитела к вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1, - все образцы выявлены как отрицательные.

Дополнительными исследованиями коллекции положительных (n=25) и отрицательных (n=25) парных образцов сыворотки и плазмы была показана их эквивалентность, что позволяет отнести показатели диагностической чувствительности и специфичности к обоим видам исследуемых проб.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).
- 5.2. Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике.
- 5.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению набора реагентов.
- 5.4. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения правил лабораторной практики.

Правила лабораторной практики и меры предосторожности, которые необходимо соблюдать при работе с набором представлены в таблице 3.

Таблица 3

	<ul style="list-style-type: none"> Постановку теста следует проводить в помещении с комнатной температурой, не превышающей установленные нормы в соответствии с существующими нормативными документами. Не изменять процедуру и протоколы проведения анализа. Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов. Не проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли которые могут повлиять на активность Реагента 2. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами Реагентов 2 и 3. Тщательно промывать лабораторную посуду. Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение. Не использовать одну и ту же емкость для работы с разными Реагентами. Нельзя допускать высыхания тест-стрипов в промежутках между отдельными операциями. Убедитесь, что тест-стрип помещается в ячейку лотка всегда маркировкой вверх (при этом на тест-стрипе должен быть ясно виден номер). В каждом исследовании обязательна постановка тест-стрипов с контрольными образцами. Убедитесь в том, что для проведения анализа был выбран нужный объем образцов и протокол проведения анализа. Все манипуляции с тест-стрипом проводить при помощи пинцета. Не использовать тест-стрипы и лотки повторно. Разрезание тест-стрипов может привести к недостоверным результатам. Накрывать лотки специальной плёнкой во избежание высыхания образцов. Промывка тест-стрипов - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов, не допускать остатка жидкости в ячейках лотка перед внесением следующего реагента. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам. Использовать валидированные дозаторы и оборудование, новые наконечники для каждого образца. Предпочтительно использование материалов одноразового использования. Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света во время инкубации и хранения. Тест-стрипы (как проявленные, так и неиспользованные) хранить вдали от источников яркого света и тепла. Все этапы инкубации проводить при помощи шейкера, если не указано дополнительно (см. п. IX. Проведение анализа). 		<ul style="list-style-type: none"> В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
	<ul style="list-style-type: none"> Не пипетировать ртом. Промывать руки после работы с набором реагентов и исследуемыми образцами. 		<ul style="list-style-type: none"> Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К-, не содержат HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С.
	<ul style="list-style-type: none"> При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами использовать спецодежду и одноразовые перчатки. 		

Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезинфицировать поверхность раствором хлорсодержащего дез. средства, согласно инструкции по применению.

• Отходы, содержащие биологические образцы, нужно нейтрализовать до сброса в канализацию. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 187-113.

• Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К+, не содержат HBsAg и антитела к вирусу гепатита С.

• При работе с реагентами набора «МилаБлот-ВИЧ», исследуемыми образцами и оборудованием нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

• Необходимо избегать контакта Реагента 3 с кожей и слизистыми.

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ-287-113).

VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная или деионизированная;
- Дозаторы пипеточные переменного объема для отбора жидкостей;
- Наконечники одноразовые для дозаторов пипеточных;
- Флаконы для приготовления промывочного раствора;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Лабораторное перемешивающее устройство шейкер, обеспечивающее медленное горизонтальное, горизонтально-вертикальное (10-15 колебаний в минуту (2-10 градусов)) или орбитальное (150-300 грм) покачивание платформы или прибор для автоматической постановки иммуноблота типа «Автоблот 3000»;

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции (ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований»).

Для анализа использовать неразведенную сыворотку или плазму. Образцы, содержащие видимые частицы, следует осветлить центрифугированием, т.к. частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложнопозитивным результатам. Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Во избежание осаждения фибрина плазму следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре $(39,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на водяной бане. Не рекомендуется использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более 3-х раз. Не рекомендуется использовать сыворотку (плазму) загрязненную или с гемолизом; или гиперлипидемией, так как это может привести к некорректным результатам.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Тест-стрипы упакованы в контейнер с силикагелем. Вскрыть контейнер и отобрать необходимое количество тест-стрипов.
- **К+, К-, Реагент 1, Реагент 2, Реагент 3.**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления:

- **Промывочный раствор (ПР) - готовится из Реагента 1.** Содержимое флакона с Реагентом 1 тщательно перемешать. Для приготовления промывочного раствора необходимый объем Реагента 1 развести соответствующим объемом воды дистиллированной или деионизированной (см. табл. 4). Полученный раствор тщательно перемешать.

Таблица 4

Расход реагентов набора при ручной постановке

Количество используемых стрипов		3	6	9	12	15	18	24	36
ПР	Реагент 1, мл	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	90,0	120,0
	Вода, мл	40,0	80,0	120,0	160,0	200,0	240,0	360,0	480,0
Реагент 1, мл		6,0	12,0	18,0	24,0	30,0	36,0	48,0	72,0
Реагент 2, мл		3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	24,0	36,0
Реагент 3, мл		3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	24,0	36,0

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед использованием набор выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре. Реагент 2 тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Внимание!

- Возможны два протокола проведения анализа в зависимости от времени инкубации с образцом (протокол 1 - 2 ч, протокол 2 - 16-18 ч).
- Положительный и отрицательный контрольные образцы необходимы в каждой постановке, независимо от количества анализируемых образцов.

При постановке теста:

- Тщательно приклеивайте пленку к лотку, чтобы избежать перетекания жидкости из одной лунки в другую во время инкубации.
- Аккуратно устанавливайте лоток на шейкер, чтобы не допустить смачивания пленки.
- Во время инкубационных этапов и этапов отмычки тест-стрип должен быть полностью погружён в жидкость маркировкой вверх.
- Шейкер должен перемешивать содержимое ячейки таким образом, чтобы жидкость омывала тест-стрип, но не переливалась через края ячейки.
- Плёнку с лотка после окончания инкубации поместите в ёмкость для дезинфекции. Тщательно удалите жидкость из каждой ячейки при помощи вакуумного аспиратора или автоматической пипетки.
- Используйте новый наконечник для каждой ячейки.
- Не нарушайте целостность тест-стрипов при аспирации жидкости.

Промывка

- Избегайте перетекания жидкости из одной лунки в другую во время этапов отмычки.
- Следите, чтобы тест-стрип был полностью погружён в промывочный раствор; не позволяйте тест-стрипам высыхать между этапами процедуры отмычки.
- Тщательно удаляйте жидкость из каждой ячейки лотка при помощи вакуумного аспиратора или автоматической пипетки.
- Используйте новый наконечник для каждой ячейки.

Этап	Протокол 1	Протокол 2
1	Внесите по 2 мл Реагента 1 в каждую ячейку лотка.	
2	С помощью пинцета в каждую ячейку аккуратно маркировкой вверх поместите по 1 тест-стрипу, полностью погружая его в жидкость.	
3	Проинкубируйте тест-стрипы на шейкере в течение 5 мин при температуре от 18 до 30 °С.	
4	Внесите по 20 мкл исследуемого образца сыворотки (плазмы) или контрольных (K ⁺ , K ⁻) образцов в соответствующие ячейки лотка	Внесите по 10 мкл исследуемого образца сыворотки (плазмы) или контрольных (K ⁺ , K ⁻) образцов в соответствующие ячейки лотка
5	Заклейте лоток плёнкой и инкубируйте образцы в течение 2 часов при температуре от 18 до 30 °С на шейкере.	Заклейте лоток плёнкой и инкубируйте образцы в течение 16-18 часов при температуре от 18 до 30°С на шейкере.
6	Осторожно снимите плёнку с лотка после окончания инкубации. Тщательно удалите жидкость из каждой ячейки при помощи вакуумного аспиратора или пипеточного дозатора. Не нарушайте целостность тест-стрипов при аспирации жидкости. Используйте новый наконечник для каждой ячейки.	
7	Промойте каждый тест-стрип 2 мл ПР 3 раза. При первой промывке раствор удалите сразу же после внесения. При второй и третьей промывках выдерживайте тест-стрипы в растворе 5 минут на шейкере. Тщательно удалите жидкость из каждой ячейки при помощи вакуумного аспиратора или пипеточного дозатора. Не нарушайте целостность тест-стрипов при аспирации жидкости. Используйте новый наконечник для каждой ячейки.	
8	Внесите по 1 мл Реагента 2 в каждую ячейку лотка, закройте лоток новой плёнкой.	
9	Инкубируйте в течение 1 часа при температуре от 18 до 30 °С на шейкере.	
10	По истечении указанного времени содержимое ячеек удалите в емкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вакуумного аспиратора или пипеточного дозатора) и промойте каждый тест-стрип 2 мл ПР 3 раза. При первой промывке раствор удалите сразу же после внесения. При второй и третьей промывках выдерживайте тест-стрипы в растворе 10 минут на шейкере. Тщательно удалите жидкость из каждой ячейки лотка при помощи вакуумного аспиратора или пипеточного дозатора. Используйте новый наконечник для каждой ячейки.	

12	Промойте каждый тест-стрип 5 мл дистиллированной или деионизированной воды 2 раза без инкубации.
13	Внесите по 1 мл Реагента 3 в каждую ячейку.
14	Инкубируйте 10 мин при температуре от 18 до 30 °C на шейкере.
15	Удалите жидкость из ячеек и промойте тест-стрипы 2 мл дистиллированной или деионизированной воды 3 раза. При первой промывке воду удалите сразу же после внесения. При второй и третьей промывках выдерживайте тест-стрипы в воде 5 минут на шейкере.
16	Удалите жидкость из ячеек, выньте тест-стрипы пинцетом и положите их маркировкой вверх на фильтровальную бумагу. Сушите тест-стрипы в защищённом от света месте не менее 15 минут.
17	После высыхания тест-стрипов закрепите их в форме для учета результатов анализа. Используя трафарет-схему расположения полос, соответствующих определенным белкам ВИЧ-1,2, проведите учёт полученных результатов сразу после высыхания тест-стрипов.

Схема проведения анализа приведена в Приложении.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внимание! Учёт результатов проводится сразу после полного высыхания тест-стрипов.

Учет результатов проводится визуально

11.1. Расположение и идентификация антигенов и контрольных линий на тест-стрипе.

Антигенные и контрольные линии расположены на тест-стрипе в следующем порядке:

- идентификационный номер;
- антигенные линии:

ВИЧ-1:

- gp 160 - env1
- gp 120 - env1
- gp 41 - env1
- p51/66 - pol
- p 31 - pol
- p24 - gag
- p17 - gag

ВИЧ-1 группа O:

- gp 41 - env1

ВИЧ-2:

- gp 36 - env2
- gp 105 - env2

контрольные линии:

- 1 - cut off;
- 2 - контроль внесения конъюгата;
- 3 - контроль внесения образца;
- 4 - контроль специфичности.



11.2. Критерии качества проведения анализа:

На всех тест-стрипах должны присутствовать контрольные полосы 1, 2, 3: интенсивность окрашивания контрольной линии 1 (cut off) должна быть меньше интенсивности окрашивания контрольных линий 2 и 3, которые должны быть четко видимыми. Отсутствие данных контрольных полос указывает на ошибку при проведении анализа. В таком случае тестируемые образцы не могут быть оценены и необходимо проведение повторного анализа на новом тест-стрипе.

Контрольная линия 4 (контроль специфичности) должна отсутствовать или допускаться интенсивность окраски контрольной линии 4 меньше cut off.

Положительный контроль: на тест-стрипе с положительным контрольным образцом присутствуют полосы антигенных линий ВИЧ-1 (gp160, gp120, gp41, p51/66, p31, gag24, gag17, gp41 группы O) и ВИЧ-2 (gp36, gp105) и контрольные полосы 1, 2, 3. Окрашивание линий gag17 и gp105 может отсутствовать или соответствовать по интенсивности контрольной линии 1 (cut off).

Отрицательный контроль: на тест-стрипе с отрицательным контрольным образцом полосы, соответствующие вирусным белкам, отсутствуют, присутствуют только полосы внутреннего контроля (1, 2 и 3).



3. Интерпретация результатов:

Интенсивность окрашивания линий на тест-стрипе оценивается визуально для каждого исследуемого образца отдельно по сравнению с интенсивностью окрашивания контрольной линии cut off.

Для облегчения оценки результата прилагается трафарет-схема и специальная форма для учета результатов. Закрепите проявленные тест-стрипы в форме для учёта результатов таким образом, чтобы контрольная линия 3 совпала с линией на форме для учёта результатов. При интерпретации результатов учитывается полоса, соответствующая антигену ВИЧ, если интенсивность ее окрашивания равна или выше интенсивности окрашивания полосы cut off. Интерпретация результатов проводится по таблице 5.

Таблица 5

Интерпретация результатов		
Нет линий с интенсивностью выше Cut off		отрицательный
1 линия с интенсивностью выше Cut off	любая другая линия	неопределенный
2 линии с интенсивностью выше Cut off	нет env 1 env1 + gag или pol 2 env1 1 env2 + gag или pol 2 env2 любая другая комбинация	неопределенный ВИЧ-1 ВИЧ-1 ВИЧ-2 ВИЧ-2 неопределенный
3 и более линий с интенсивностью выше Cut off	нет env 1 env1 + gag + pol 2 (и более) env1 + gag или pol 1 env2 + gag + pol 2 env2 + gag или pol Более 2 env1 1 env1 + 1 env2 2 env1+2 env2 1 (или более) env1 + 1 (или более) env2 + gag или pol 1 (или более) env1 + 1 (или более) env2 + gag + pol	неопределенный ВИЧ-1 ВИЧ-1 ВИЧ-2 ВИЧ-2 ВИЧ-1 ВИЧ* ВИЧ* ВИЧ* ВИЧ*

*- В случае если интенсивность окрашивания полос env2 выше интенсивности полос env1, образец определяется как **ВИЧ-2** положительный.

11.4. Примечания:

- Если все антигенные линии тест-стрипа имеют интенсивность на уровне cut off, результаты постановки не могут учитываться. Исследование тестируемого образца повторите.
- При получении неопределенного результата рекомендуется повторить анализ образца по протоколу 2, а также провести повторный забор крови через 3-4 недели и новое исследование на появление антител к антигенам ВИЧ-1 и ВИЧ-2.
- неопределённые результаты могут проявляться в случае сероконверсии или перекрёстной реакции с другими ретровирусами.
- контаминация исследуемого образца другой положительной сывороткой может привести к положительному или неопределённому результату.

Пример существующих в настоящее время критериев позитивности в вестерн-блоте:

Таблица 6

WHO	Две полосы ENV с или без GAG или POL
CRSS, Pan American Health Organization	Одна полоса p24 или p31 и одна полоса ENV
CDC/ASTPHLD	Комбинация из двух полос : gp41 или gp120/gp160 или p24
DVV	Одна полоса ENV и по крайней мере одна полоса GAG или POL, (см. так же DIN 58 969, часть 41)
FDA	Полосы p24 и p31 и одна из полос: gp41 или gp120/gp160
SFTS France	Две полосы ENV (gp160 и gp120) с GAG или POL - (позитивный) Env (gp160) и GAG(p24) - (возможно позитивный) Только две ENV полосы (gp160 and gp120) - (возможно позитивный)
Американский красный крест (США)	По одной полосе GAG, POL и ENV
Институт Пауля Эрлиха (Германия)	Две полосы, одна должна быть ENV

Китай	Две полосы ENV (gp160/gp41 и gp120) и любая из GAG или POL
Сингапур	Две полосы ENV (gp160/gp41 и gp120) и любая из GAG или POL
Австралия	Одна полоса ENV и любые 3 GAG или POL

WHO - World Health Organization; Всемирная организация здравоохранения;

CRSS - Consortium for Retrovirus Serology Standardization; Консорциум по стандартизации ретровирусной серологии;

CDC - Center for Disease Control; Центр по контролю заболеваемости;

ASTPHLD – Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors; Ассоциация глав лабораторий государственного и территориального общественного Здравоохранения;

DVV - German Association for Control of Viral Diseases; Немецкая ассоциация по контролю вирусных заболеваний;

FDA - Food and Drug Administration, US manufacturer's, Управление по контролю за продуктами и лекарствами;

SFTS (France) - Société Française de Transfusion Sanguine; Французское общество переливания крови.

ХII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

• Не исключена возможность получения ложноотрицательных результатов вследствие вариабельности вирусов ВИЧ. Ни один из существующих в настоящий момент лабораторных тестов не даёт основание полностью исключить возможность инфицированности пациента ВИЧ.

• Отрицательный результат в данном тесте при наличии положительного результата в скрининговом тесте может свидетельствовать о ранней стадии инфекции. В этом случае рекомендуется протестировать образец в тест-системе «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН».

• Согласно СП 3.1.5.2826-10 рекомендуется повторно исследовать сыворотку через 2 недели, 3 и 6 месяцев.

• Положительный результат на контрольной линии 4 (контроль специфичности), указывает на возможность перекрестных реакций при наличии других ретровирусов, в этом случае исследуемый образец не может быть определен как ВИЧ положительный.

• Использование предварительно разведенных образцов сыворотки (плазмы) может давать ложноотрицательный результат.

ХIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

13.1	Условия и сроки хранения набора реагентов «МилаБлот-ВИЧ»			<u>Срок годности 12 месяцев.</u> Срок годности серии указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит
	Хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.			
13.2	Условия и сроки транспортирования набора реагентов «МилаБлот-ВИЧ»			
	при температуре от 2 до 8 °С.			10 сут
	при температуре до 25 °С.			
13.3	Условия и сроки хранения рабочих растворов <i>(хранить в чистой, плотно закрытой емкости, в защищенном от света месте)</i>			
	Рабочий ПР	при температуре от 2 до 8 °С		не более 14 сут
13.4.	Условия и сроки хранения неиспользованных реагентов набора после вскрытия <i>(флаконы плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в сухом, защищенном от света месте)</i>			
	Тест-стрипы, оставшиеся в контейнере	Плотно закрыть. При температуре от 2 до 8 °С.		в упаковке производителя в течение срока годности тест-системы
	Иммуносорбент	при температуре от 2 до 8 °С.		
	Неиспользованные жидкие реагенты набора	при температуре от 2 до 8 °С.		

ХIV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

• Производитель гарантирует соответствие выпускаемого продукта требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество продукта гарантируются в течение всего срока годности.

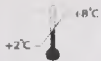
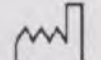
• Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 467-82-15, 467-82-18 (доб. 7647, 7655) или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: help-ds@npods.ru, info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1.рекламационного набора,

2.всех образцов кроводач пациента.

ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	Для диагностики <i>in vitro</i>		Температурные пределы хранения
	Производитель		Срок годности число/месяц/год
	Каталожный номер		Дата изготовления месяц/год
	Количество определений		Использовать инструкцию по применению
	Номер партии (серии)	Code: X.X.XX	Идентификационный код

Директор по производству
 ООО «Научно-производственное объединение
 «Диагностические системы», к.б.н.



В. К. Пименов

СОГЛАСОВАНО
 Научный руководитель
 испытательной лаборатории
 ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
 д.м.н, профессор



В. В. Долгов

25 МАЙ 2015

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 2 мл раствора Реагента 1 в ячейку лотка
2	Внести	Поместить по одному тест-стрипу в каждую ячейку
3	Инкубировать	5 минут, шейкер, при температуре от 18 до 30 °С
4	Внести	<u>Протокол 1:</u> По 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы), К+, К- <u>Протокол 2:</u> По 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы), К+, К-
5	Инкубировать	<u>Протокол 1:</u> 2 часа при температуре от 18 до 30 °С, шейкер <u>Протокол 2:</u> 16-18 часов при температуре от 18 до 30 °С, шейкер
6	Промыть тест-стрипы	По 2 мл ПР. При первой промывке раствор удалить сразу же после внесения, затем промыть 2 раза по 5 минут на шейкере
7	Внести	По 1 мл раствора Реагента 2
8	Инкубировать	1 час при температуре от 18 до 30 °С, шейкер
9	Промыть тест-стрипы	По 2 мл ПР. При первой промывке раствор удалить сразу же после внесения, затем промыть 2 раза по 10 минут на шейкере
10	Промыть тест-стрипы	2 раза по 5 мл дистиллированной / деионизированной водой без инкубации
11	Внести	По 1 мл Реагента 3
12	Инкубировать	10 минут при температуре от 18 до 30 °С, шейкер
13	Промыть тест-стрипы	По 2 мл дистиллированной / деионизированной водой. При первой промывке раствор удалить сразу же после внесения, затем промыть 2 раза по 5 минут на шейкере
14	Извлечь	Удалить раствор из ячеек и вынуть тест-стрипы на фильтровальную бумагу
15	Учет результатов	Использовать трафарет-схему и форму для учёта результатов

ПРОШЕНО
В КОЛИЧЕСТВЕ 12 ЛИСТОВ
«25» МАЙ 2015 201 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров



Внесен в
документ
инициатив

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----