

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От " " 20 г. №

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"



В.Ю.Борисов

" 7 " 03 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
"ИФА-БЛОТ-ВИЧ-1"

Тест-система иммуноферментная для выявления антител
к индивидуальным белкам вируса иммунодефицита человека 1 типа методом
иммунного блоттинга¹

Регистрационное удостоверение №

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антител к индивидуальным белкам ВИЧ-1 в сыворотке (плазме) крови человека методом иммунного блоттинга (формат "Вестерн-Блот") – тест, подтверждающий выявление антител к ВИЧ-1.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Набор выпускается в 4 базовых вариантах комплектации:

Иммуносор- бент	полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны с сорбированными на них методом электропереноса индивидуальными белками (антигенами) ВИЧ-1: gp160, p110/120, p68/66, p55, p52/51, gp41, p40, p34/31, p24/25, p18/17; в виде контрольной линии нанесены антитела против IgG человека – для контроля правильности проведения реакции	компл. №1/1	компл. №1/2	компл. №2/1	компл. №2/2
		18 стрипов	24 стрипа	18 стрипов	24 стрипа
		стрипы – в пластиковом контейнере с крышкой			
Контроль- ный положитель- ный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная жидкость светло-желтого цвета	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)
Контроль- ный отрицатель- ный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная жидкость светло-желтого цвета	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)
Конъюгат (концентрат)	козьи антитела против иммуноглобулинов G человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (1,2 мл)	1 фл. (1,6мл)	-	-
Конъюгат	козьи антитела против иммуноглобулинов G человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой; непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета	-	-	1 фл. (45 мл)	2 фл. (по 30 мл)

¹ Взамен инструкции, утвержденной 12 марта 2012 г. № 903-Пр/12

Окрашивающий раствор	5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий; прозрачная светло-зеленого цвета жидкость	1 фл. (45 мл)	2 фл. (по 30 мл)	1 фл. (45 мл)	2 фл. (по 30 мл)
5-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(x5)]	непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета; возможно выпадение осадка, растворяющегося при встряхивании	2 фл. (по 50 мл)	3 фл. (по 50 мл)	2 фл. (по 50 мл)	3 фл. (по 50 мл)
Раствор для разведения сывороток и конъюгата (РРСК)	непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета; возможно выпадение осадка, растворяющегося при встряхивании	2 фл. (по 45 мл)	3 фл. (по 45 мл)	-	-
Раствор для разведения сывороток (РРС)	непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета; возможно выпадение осадка, растворяющегося при встряхивании	-	-	1 фл. (45 мл)	2 фл. (по 30 мл)
Референс-стрип (или его фотография)	стрип с проявленным белковым профилем антигена ВИЧ-1	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. Допускается использование неспецифических реагентов (окрашивающий раствор, ПР(x5)) разных серий набора или их смешение.

Набор дополнительно комплектуется ванночками пластмассовыми с лунками для проведения реакции (на 6 стрипов каждая) и пинцетом пластиковым.

По желанию потребителя базовая комплектация любого варианта набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовые варианты комплектации набора позволяют исследование 18 (комплекты №№ 1/1 и 2/1) и 24 (комплекты №№ 1/2 и 2/2) образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 2 стрипа). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов. При этом допускается исследование контрольных образцов только в первой постановке после вскрытия набора.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В основе теста лежит метод непрямого иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозной мембране, на которую методом электропереноса нанесены основные индивидуальные белки ВИЧ-1, полученные при электрофоретическом разделении лизатного антигена ВИЧ-1.

Антитела к ВИЧ-1 (при их наличии в исследуемом образце) связываются с индивидуальными белками ВИЧ-1, сорбированными на стрипе. Полученные комплексы затем связываются с конъюгатом, ферментативная активность которого приводит к появлению окрашенных полос на стрипах в зонах локализации соответствующих индивидуальных белков ВИЧ-1.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность набора при определении на сыворотках стандартной панели ОСО 42-28-212-02П – 100 %.

Диагностическая специфичность набора при определении на сыворотках стандартной панели ОСО 42-28-214-02П – 100 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Тест следует проводить с цельной сывороткой или плазмой крови человека, в которой по результатам предварительного скринингового исследования обнаружены антитела к ВИЧ-1.

Образцы сыворотки (плазмы) следует хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут; для более длительного хранения образцы должны храниться при температуре минус 20 °С.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание исследуемых образцов. После размораживания образцы сыворотки (плазмы) крови следует отцентрифугировать при 3000 об/мин в течение 10-15 мин.

Исследование образцов с выраженным гемолизом, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, не допускается

Если образцы необходимо транспортировать, они должны быть упакованы в соответствии с правилами транспортировки инфекционного материала.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако исследуемые образцы следует считать потенциально инфицированными.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Качество полученных результатов зависит от точного соблюдения следующих правил:

- перед использованием набор реагентов следует выдержать при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не менее 30 мин;
- при работе со стрипами пользоваться резиновыми перчатками и пластмассовым пинцетом; прикосновение пальцев может оставить пятна.

Оборудование и материалы

- Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).
- Градуированные цилиндры на 50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл.
- Автоматические или полуавтоматические пипетки с переменным или постоянным объемом, позволяющие дозировать 20 мкл и 2,0 мл.
- Наконечники одноразовые на 0,5-250 мкл и 1-5 мл.
- Шейкер-качалка с углом наклона платформы 6-8° и частотой качания 30-40 об/мин, или орбитальный шейкер с диаметром орбиты 10-22 мм и частотой вращения 90-160 об/мин, или орбитальный шейкер на 20-60 об/мин.
- Одноразовые перчатки.
- Вакуумный насос для отсасывания жидкости с герметичной емкостью для отходов.
- 6% раствор перекиси водорода.
- Фильтровальная бумага.
- Пластмассовый пинцет.

Подготовка рабочих реагентов.

Иммуносорбент, K⁺, K⁻, окрашивающий раствор, РРСК (в комплектах №1/1, №1/2), РРС и конъюгат (в комплектах №2/1, №2/2) готовы к применению.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Приготовление рабочего промывочного раствора

ПР(х5) развести водой очищенной, используя соотношения реагентов, указанные в табл. 1.

Таблица 1

Реагент	Ед. изм.	Количество компонента при использовании стрипов			
		6	12	18	24
ПР(х5)	мл	20	40	60	80

Вода очищенная	мл	80	160	240	320
----------------	----	----	-----	-----	-----

Рабочий промывочный раствор стабилен при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.

Приготовление рабочего разведения конъюгата (для комплектов №№ 1/1 и 1/2)

Концентрат конъюгата развести РРСК, используя соотношения реагентов, указанные в табл.2.

Таблица 2

Реагент	Ед. изм.	Количество компонента при использовании стрипов			
		6	12	18	24
Конъюгат	мл	0,3	0,6	0,9	1,2
РРСК	мл	15	30	45	60

Рабочее разведение конъюгата стабильно в течение 4 ч при комнатной температуре и в течение 7 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Проведение анализа методом иммунного блоттинга

1. Вскрыть упаковку стрипов. Осторожно, пластмассовым пинцетом, переложить стрипы маркированной стороной вверх в лунки ванночек для проведения иммунного блоттинга, чтобы стрипы с нанесенными вирусными белками были покрыты растворами реагентов в течение всего исследования. Лунки ванночек промаркировать в соответствии с номерами исследуемых образцов.

2. Внести в каждую лунку ванночки по 2,0 мл РРСК (в комплектах №1/1, №1/2) или РРС (в комплектах №2/1, №2/2) и инкубировать 5 мин при температуре от 18 до 25 °С, на шейкере

3. Добавить по 20 мкл каждого из исследуемых и контрольных (K^+ и K^-) образцов в соответственно промаркированные лунки. Инкубировать в течение 2 ч при температуре от 18 до 25 °С, на шейкере.

4. После инкубации, используя вакуумный насос, полностью удалить жидкость из каждой лунки в емкость с дезинфицирующим раствором. Следует соблюдать осторожность, чтобы при отсасывании жидкости из лунок не выпал стрип. Наконечник отсасывающего устройства после каждого контакта с различными образцами сывороток следует промыть очищенной водой или использовать для каждого образца отдельный одноразовый наконечник во избежание перекрестной контаминации.

5. Внести в каждую лунку по 2,0 мл рабочего промывочного раствора и промыть стрипы в течение 5 мин, на шейкере. Промывку выполнить 3 раза. После последней промывки раствор удалить из лунок.

6. Внести в каждую лунку по 2,0 мл рабочего разведения конъюгата (для комплектов №№ 1/1 и 1/2) или конъюгата, готового к использованию (для комплектов №№ 2/1 и 2/2). Инкубировать в течение 1 ч при температуре от 18 до 25 °С, на шейкере.

7. 3 раза промыть каждый стрип, как указано в п. 5.

Внимание! Недостаточная промывка на этом этапе может привести к появлению на стрипе темного фона.

8. Внести в каждую лунку по 2,0 мл окрашивающего раствора. Инкубировать в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С, на шейкере, до появления на стрипе, прореагировавшем с K^+ , четких окрашенных полос (5-10 мин).

9. Для остановки реакции удалить из лунок окрашивающий раствор и промыть стрипы 3 раза очищенной водой, наливая в каждую лунку по 2,0 мл воды.

10. Осторожно, пинцетом, извлечь стрипы из лунок ванночки. Осушить стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги при комнатной температуре. Расположить их маркированной стороной кверху для оценки результатов

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перечень индивидуальных белков, входящих в состав ВИЧ-1

Присутствие в образце сыворотки (плазмы) крови человека антител к белкам ВИЧ-1

обнаруживается по появлению окрашенных полос. Их расположение соответствует молекулярным массам белков, указанным в табл. 3.

Таблица 3

Белок	Продукт гена	Описание	Визуальная характеристика окрашенной полосы на стрипе.
gr 160	ENV	Гликопротеин, предшественник gr110/120 и gr41	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета, иногда диффузная.
р 110/120	ENV	Гликопротеин оболочки	Полоса тёмно-фиолетового цвета с диффузными границами.
р 68/66	POL	Обратная транскриптаза	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета.
р 55	GAG	Предшественник белков нуклеокапсида (core)	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета, иногда в виде двойной линии.
р 52/51	POL	Протеаза	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета.
gr 41	ENV	Трансмембранный гликопротеин	Полоса тёмно-фиолетового цвета с диффузными границами.
р 40	GAG	Предшественник белков нуклеокапсида	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета.
р 34/31	POL	Эндонуклеаза	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета.
р 24/25	GAG	Белок нуклеокапсида	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета.
р 18/17	GAG	Белок нуклеокапсида	Полоса тёмно-фиолетового цвета, иногда в виде двойной линии.

Учет результатов исследования сывороток проводят при следующих условиях:

- На каждом стрипе должна быть ярко окрашена контрольная линия – полоса контроля правильности проведения реакции
- белковый профиль на стрипе с **K⁺** соответствует референс-стрипу; присутствие или отсутствие полосы р18 не является необходимым условием для оценки достоверности полученных результатов
- стрип с **K⁻** не имеет окрашенных полос.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов

Проводится по критериям, разработанным Всемирной организацией здравоохранения (WHO), по критериям Консорциума по стандартизации исследования ретровирусов (CRSS):

Результат	Критерии WHO	Критерии CRSS
Положительный	2 ENV + GAG + POL	1 ENV +(1GAG или 1POL)
Неопределенный	1 ENV + GAG + POL GAG + POL GAG POL	GAG + POL или GAG или POL или ENV
Отрицательный	Отсутствие полос. Полосы, не соответствующие белкам ВИЧ-1.	Отсутствие полос. Полосы, не соответствующие белкам ВИЧ-1.

Неопределенный результат может означать, что:

- в образце содержатся антитела к ВИЧ-2;
- образец получен в период сероконверсии;
- наблюдается неспецифическая реакция, вызванная наличием антител к другим ретровирусам.

При проведении входного контроля набора характеристика полос на стрипах с сыворотками, содержащими антитела к ВИЧ-1 (ОСО 42-28-212-02П), должна соответствовать характеристике, указанной в паспорте на серию ОСО 42-28-212-02П; на стрипах с сыворотками, не содержащими антитела и антиген р24 ВИЧ-1 (ОСО 42-28-214-02П), полосы должны отсутствовать. Возможно появление тонкой, слабоокрашенной неспецифической полосы в области gr41. Важно не перепутать эту полосу с полосой гликопротеина gr41, которая проявляется в виде полосы тёмно-фиолетового цвета с диффузными границами.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование

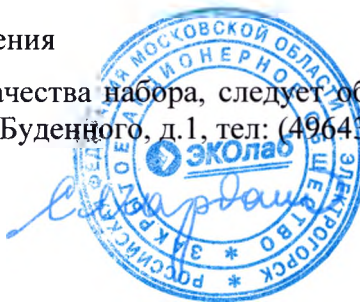
При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1, тел: (49643)3-1374, 3-2311, факс 3-3143

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке



С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Директор ФГБУ "ГНЦДК" Минздрава России,
Академик РАМН, профессор

" 21 " 01 2013 г.



А.А.Кубанова

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

с лист с6

Президент ЗАО "ЭКОлаб"

Марданлы С.Г.

"8" 04 2013г.