

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

" 29 "



В.Ю. Борисов

2015 г.

Инструкция по применению набора реагентов "ИФА-Блот-ВИЧ-2"

Тест-система иммуноферментная для выявления антител
к индивидуальным белкам вируса иммунодефицита человека 2 типа
методом иммунного блоттинга

Регистрационное удостоверение №..... от г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антител к индивидуальным белкам ВИЧ-2 в сыворотке (плазме) крови человека методом иммунного блоттинга (формат "Вестерн-Блот") – тест, подтверждающий выявление антител к ВИЧ-2.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны с сорбированными на них методом электропереноса индивидуальными белками (антигенами) ВИЧ-2: gp140, gp105, p68, p56, gp36, p34, p26, p16; в виде контрольной линии нанесены антитела против IgG человека – для контроля правильности проведения реакции (стрипы – в пластиковом контейнере с крышкой)	24 стрипа
Конъюгат	козьи антитела против иммуноглобулинов G человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой; непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета, возможно выпадение осадка, растворяющегося при встряхивании	2 фл. (по 30 мл)
Окрашивающий раствор	5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий; прозрачная светло-зеленого цвета жидкость	2 фл. (по 30 мл)
5-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(x5)]	непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета; возможно выпадение осадка, растворяющегося при встряхивании	3 фл. (по 50 мл)
Раствор для разведения сывороток (PPC)	непрозрачная пенящаяся жидкость светло-желтого цвета; возможно выпадение осадка, растворяющегося при встряхивании	2 фл. (по 30 мл)

Референс-стрип (или его фотография)	стрип с проявленным белковым профилем антигена ВИЧ-2	1 шт.
---	---	-------

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

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

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации позволяет одномоментное исследование 24 образцов. Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В основе теста лежит метод непрямого иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозной мембране, на которую методом электропереноса нанесены основные индивидуальные белки ВИЧ-2, полученные при электрофоретическом разделении лизатного антигена ВИЧ-2.

Антитела к ВИЧ-2 (при их наличии в исследуемом образце) связываются с индивидуальными белками ВИЧ-2, 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-2.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность набора определяется на сыворотках, содержащих антитела к антигенам ВИЧ-2 (СОП⁺_{ВИЧ-2-042}), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность набора определяется на сыворотках, не содержащих антитела к антигенам ВИЧ-2 (СОП_{ВИЧ-040}), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Для дополнительной оценки специфичности тест-системы «ИФА-Блот-ВИЧ-2» были проведены исследования 22 образцов сывороток доноров крови, 9 сывороток беременных женщин, 13 сывороток здоровых новорожденных детей. Также исследовались 113 образцов сывороток, содержащих маркеры инфекционных заболеваний, таких как гепатит В (22 образца), гепатит С (22 образца), гепатит А (10 образцов), сифилис (7 образцов), цитомегаловирусная инфекция (17 образцов), токсоплазмоз (12 образцов), герпес 1 типа (5 образцов), краснуха (18 образцов).

Все 157 протестированных образцов показали отрицательный результат в тест-системе «ИФА-Блот-ВИЧ-2».

Исследование 66 образцов, имеющих положительный результат на наличие антител к ВИЧ-1 по результатам скрининговых тестов и подтвержденных в иммуноблоте на ВИЧ-1, показало следующие результаты: все

образцы были интерпретированы как неопределенные по наличию антител к антигену p26, который является гомологичным антигену p24 ВИЧ-1. Образцов, положительных по ВИЧ-2, выявлено не было.

Таким образом, диагностическая чувствительность набора составила более 97%, диагностическая специфичность – более 97%.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или плазма с цитратная крови человека, объемом не менее 20 мкл.

Тест следует проводить с цельной сывороткой или плазмой крови человека, в которой по результатам предварительного скринингового исследования обнаружены антитела к ВИЧ-2.

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.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Качество полученных результатов зависит от соблюдения следующих правил:

- перед использованием набор реагентов следует выдержать при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не менее 30 мин;
- не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
- не смешивать реагенты из различных серий при проведении анализа;
- при работе со стрипами пользоваться одноразовыми перчатками и пластмассовым пинцетом;
- не прикасаться к стрипам не защищенной рукой, прикосновение пальцев может оставить пятна.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

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, конъюгат, окрашивающий раствор, РРС готовы к применению.

Приготовление рабочего промывочного раствора

ПР(х5) развести водой очищенной, используя соотношения реагентов, указанные в табл. 2.

Таблица 2

Реагент	Ед. изм.	Объем 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.

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 РРС и инкубировать 5 мин при температуре от 18 до 25 °С, на шейкере.

3. Добавить по 20 мкл каждого из исследуемых образцов в соответственно промаркированные лунки. Инкубировать в течение 60 мин 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 конъюгата. Инкубировать в течение 30 мин 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 5-10 мин.

9. Для остановки реакции удалить из лунок окрашивающий раствор и промыть стрипы 3 раза водой очищенной, 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 вверх для оценки результатов.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводить, ориентируясь на белковый профиль ВИЧ-2 референс-стрипа.

Перечень индивидуальных белков, входящих в состав ВИЧ-2

Присутствие в образце сыворотки (плазмы) крови человека антител к белкам ВИЧ-2 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
gp 140	ENV	Гликопротеин, предшественник gp105 и gp36	Диффузная полоса фиолетового цвета
gp 105	ENV	Гликопротеин оболочки	Диффузная полоса фиолетового цвета
p 68	POL	Обратная транскриптаза	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета
p 56	GAG	Предшественник белков нуклеокапсида (core)	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета
gp 36	ENV	Трансмембранный гликопротеин	Диффузная полоса тёмно-фиолетового цвета
p 34	POL	Эндонуклеаза	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета
p 26	GAG	Ядерный белок	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета
p 16	GAG	Ядерный белок	Четкая полоса тёмно-фиолетового цвета

Учет результатов исследования сывороток проводят при следующих условиях:

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ (ИФА-Блот-ВИЧ-2)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией

Внести	в лунки ванночек по одному стрипу для каждого контрольного и исследуемого образца; в каждую лунку – по 2,0 мл РРС
Инкубация	5 мин, 18-25 °С, на шейкере
Внести	по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	60 мин, 18-25 °С, на шейкере
Промыть	3 раза ПР
Внести	в каждую лунку по 2,0 мл конъюгата
Инкубация	30 мин, 18-25 °С, на шейкере
Промыть	3 раза ПР
Внести	в каждую лунку по 2,0 мл окрашивающего раствора
Инкубация	5-10 мин, 18-25 °С, на шейкере
Промыть	3 раза водой очищенной
Высушить стрипы между листов фильтровальной бумаги и зарегистрировать результаты	

- На каждом стрипе должна быть ярко окрашена контрольная линия – полоса контроля правильности проведения реакции
- Номер иммуносорбента, указанный на пробирке со стрипами, соответствует номеру референс-стрипа.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов

Критерии	Результат
1 ENV +(1GAG или 1POL)	Положительный
GAG + POL	Неопределённый
GAG	Неопределённый
POL	Неопределённый
ENV	Неопределённый
Отсутствие специфических полос.	Отрицательный

Неопределенный результат может означать следующее:

- образец получен в период сероконверсии;
- наблюдается неспецифическая реакция, вызванная наличием антител к другим ретровирусам.

Возможно появление тонкой слабоокрашенной полосы в области белка р26. В том случае, если на стрипе присутствует только данная полоса слабой интенсивности, - результат считать **отрицательным**.

СРОК ГОДНОСТИ

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

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

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 "ИФА-БЛОТ-ВИЧ-2", 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 научной работе С.Д. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Научный руководитель испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

д.м.н., профессор _____

Долгов В.В

« ____ » _____ 2015 г.

15 АПР 2015

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 6 ЛИСТОВ
«___» 15 АПР 2019 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

