

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
От 29 июля 2013 г. № 3550-Пр/13

"УТВЕРЖДАЮ"
Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"
В.Ю.Борисов
"15" 04 2013г.



Инструкция
по применению набора реагентов
"ИФА Лайн-Блот ВИЧ-1,2"

Тест-система иммуноферментная для выявления антител к антигенам вируса иммунодефицита человека типов 1 и 2 методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов

Регистрационное удостоверение № 2012/13332

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ИФА Лайн-Блот ВИЧ-1,2» предназначен для подтверждения, выявления антител к отдельным антигенам вируса иммунодефицита человека типов 1 и 2 (ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О и ВИЧ-2) методом иммунного блоттинга в образцах сыворотки (плазмы) крови человека при «ручной» постановке или с использованием систем для автоматизации иммуноблоттинга.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект №1	Комплект №2	Комплект №3
Иммуносорбент	<p>Полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны белого цвета, с нанесенными на них в виде отдельных поперечных полос:</p> <ul style="list-style-type: none"> • рекомбинантных аналогов антигенов ВИЧ-1,2 - Env 160, Env 41, Gag 1, Pol 1, Env 2; • рекомбинантного антигена, не содержащего антигенных детерминант ВИЧ- для контроля специфичности реакции (K_{Ag}); • антител против IgG человека – сыворотка диагностическая видоспецифическая против IgG человека - для контроля правильности проведения реакции (K_{реакции}). <p>Нанесенные на стрипы антигены визуально не определяют. Стрипы промаркированы и находятся в пластмассовом контейнере (пробирке) с крышкой.</p>	24 стрипа	36 стрипов	48 стрипов

КОПИЯ ВЕРНА

подпись

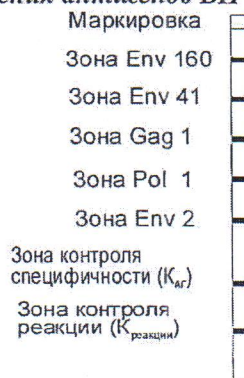
Ген. директор
ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В. Ю.



Контрольный отрицательный образец (К ⁻)	Сыворотка крови человека, не содержащая антигены и антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость фиолетового цвета.	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)
Контрольный положительный образец (К ⁺)	Сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розово-красного цвета.	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)	1 фл. (0,2 мл)
25-кратный концентрат отмывающего раствора [ОР(x25)]	Прозрачная бесцветная слегка пенящаяся жидкость.	1 фл. (30 мл)	1 фл. (30 мл)	2 фл. (30 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	Непрозрачная, пенящаяся светло-желтого цвета жидкость; при хранении возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	1 фл. (30 мл)	1 фл. (40 мл)	2 фл. (30 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	Слегка опалесцирующая пенящаяся бесцветная жидкость.	1 фл. (40 мл)	2 фл. (30 мл)	2 фл. (40 мл)
Конъюгат	Моноклональные мышинные антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена; прозрачная жидкость.	1 фл. (2,5 мл)	1 фл. (2,5 мл)	2 фл. (2,5 мл)
Хромоген (ТМБ)	Раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина; прозрачная светло-зеленого цвета жидкость.	1 фл. (40 мл)	1 фл. (40 мл)	2 фл. (40 мл)
<p>В каждый набор входят также: планшеты пластмассовые с 8 или 6 канавками (3 или 4 шт. в комплекте №1, 5 или 6 шт. в комплекте №2, 6 или 8 шт. в комплекте №3); клейкая пленка для планшетов - (3 или 4 шт. в комплекте №1, 5 или 6 шт. в комплекте №2, 6 или 8 шт. в комплекте №3); пинцет пластиковый – 1 шт.</p>				

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

Стандартная схема нанесения антигенов ВИЧ-1,2 и контролей на стрип



КОПИЯ ВЕРНА

ПОДПИСЬ

*Ген. директор
 ЗАО "ЭКОлаб"
 Борисов В.А.*



Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложены инструкция по применению и протокол учета результатов исследования.

По желанию потребителя базовая комплектация наборов (число индивидуальных упаковок с компонентами и их объемы) может быть изменена.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В основе теста лежит метод непрямого иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозной мембране, на которую в виде отдельных полосок нанесены рекомбинантные аналоги антигенов ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О и ВИЧ-2, а также контроли специфичности и правильности проведения реакции.

При наличии в исследуемом образце антител к ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О или ВИЧ-2 они связываются с антигенами ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О и ВИЧ-2, нанесенными на стрип, образуя комплекс антиген-антитело, который при внесении в реакционную среду конъюгата – моноклональных мышиных антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, образует комплекс антиген-антитело-конъюгат, выявляемый по цветной реакции с хромогеном (окрашивание соответствующей полоски на стрипе).

Антитела к ВИЧ-1 обнаруживаются по связыванию с антигенами Env 160 – gp120 и gp41 (ВИЧ-1 и ВИЧ-1 группы О), Env 41 – gp41 (ВИЧ-1), Gag 1 – p24 и p17 (ВИЧ-1), Pol 1 – p51 (ВИЧ-1). Антитела к ВИЧ-2 обнаруживаются по связыванию с антигенами Env 2 – gp36 (ВИЧ-2). Антитела к ВИЧ-1 группы О обнаруживаются по связыванию с антигеном Env 160 – gp120 и gp41 (ВИЧ-1 и ВИЧ-1 группы О).

Набор позволяет проведение анализа по двум протоколам – с 18-часовой (протокол №1) и 2-часовой (протокол № 2) инкубацией стрипов с исследуемыми образцами.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект №1 – рассчитан на исследование 24 образцов.

Комплект №2 – рассчитан на исследование 36 образцов.

Комплект №3 – рассчитан на исследование 48 образцов, включая контрольные.

Диагностическая чувствительность и специфичность на сыворотках стандартизованных панелей предприятия, содержащих и не содержащих соответствующие антитела – 100 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 20 мкл.

Образцы до исследования хранить не более 7 суток при температуре от 2 до 8 °С или до 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократный цикл замораживания-размораживания образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается исследовать образцы с повышенным содержанием липидов или признаками гемолиза или с видимыми признаками микробного пророста.

Образцы, содержащие осадок, перед исследованием центрифугируют в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом, строго выполняя требования безопасности при серологических исследованиях материалов, содержащих возбудителей I и II групп патогенности (СП 1.32322-08).

Достоверность результатов исследования зависит от строгого выполнения следующих правил:

Не использовать набор с истекшим сроком годности.

Использовать реагенты только данной серии набора.

КОПИЯ ВЕРНА

подпись

Ген. директор
ЗАО «ЭКОЛАБ»
Борисов В.Ю.



Не использовать стрипы повторно.

Планшеты со стрипами в ходе всех отдельных стадий реакции и отмывок помещать на автоматический шейкер.

При работе со стрипами -использовать защитные перчатки и пинцет; так как прикосновение пальцев может оставить пятна.

Использовать для внесения каждой пробы одноразовый наконечник.

Никогда не использовать одну и ту же ёмкость для конъюгата и хромогена.

Не проводить исследование в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов.

Стекланную посуду тщательно мыть и ополаскивать водой очищенной или использовать одноразовую посуду.

Не допускать контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и хромогеном, так как ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металлов.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

- вода очищенная (дистиллированная или деионизованная);
- пипетки автоматические или полуавтоматические с переменным или постоянным объемом, позволяющие дозировать 20-200, 100-1000 мкл и 5,0 мл.
- наконечники одноразовые для автоматических (полуавтоматических) пипеток;
- спирт этиловый 70%;
- раствор перекиси водорода 6%;
- резиновые перчатки;
- вата гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- центрифуга настольная на 2500–3000 об/мин;
- мерный стакан или цилиндр необходимого объема;
- контейнеры для сбора отходов (отдельно для жидких и твердых);
- аспиратор вакуумный;
- шейкер качающий или шейкер орбитальный.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Перед использованием все компоненты набора выдержать 30 мин. при температуре от 18 до 25 °С.

1. Приготовление растворов и реагентов

1.1. Приготовление рабочего отмывающего раствора

ОР(х25) интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при 35-37 °С в течение 30 мин до полного растворения солей). Отобрать необходимый объем ОР(х25) и довести до заданного объема водой очищенной (объемы ОР(х25) и воды, необходимые для постановки с использованием разного числа стрипов, приведены в табл. 1). Полученный раствор перемешать.

Таблица 1

Реагент	Объем реагента, мл, на ...стрипов									
	6	8	12	16	18	24	30	36	40	48
ОР(х25)	4,0	6,0	8,0	11	12	20	24	28	32	40
вода очищенная	до 100	до 150	до 200	до 275	до 300	до 500	до 600	до 700	до 800	до 1000

При использовании автоматического анализатора содержимое флакона ОР(х25) довести до 750 мл водой очищенной.

При первом использовании набора раствор можно готовить к моменту окончания первой инкубации (п. 2.4).

КОПИЯ ВЕРНА

Подпись

Ген. директор
ЗАО «ЭКОлаб»
Берисов В.Ю.



Готовый раствор хранить при комнатной температуре не более 48 ч, при температуре от 2 до 8°C - не более 14 дней.

1.2. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Необходимый объем РРК перенести в чистую емкость и добавить необходимый объем конъюгата (объемы конъюгата и РРК, необходимые для постановки с использованием разного числа стрипов, приведены в табл. 2). Полученный раствор перемешать.

Таблица 2

Реагент		Объем реагента, мл, на ...стрипов									
		6	8	12	16	18	24	30	36	40	48
РРК, мл		9	12	18	24	27	36	45	54	60	72
Конъюгат, мкл	протокол № 1 18 - часовая инкубация										
	протокол № 2 2 - часовая инкубация										

При использовании автоматического анализатора во флакон с РРК (30 мл) комплекта №2, внести _____ мкл конъюгата при анализе по протоколу № 1 или _____ мкл конъюгата при анализе по протоколу № 2.

При использовании автоматического анализатора во флакон с РРК (40 мл)- комплектов №1, №3, внести _____ мкл конъюгата при анализе по протоколу № 1 или _____ мкл конъюгата при анализе по протоколу № 2.

Примечание: Объемы конъюгата, вносимые в РРК, определяются для каждой серии набора.

Рабочий раствор конъюгата готовить непосредственно перед использованием. Раствор стабилен не более 15 мин.

1.3. Подготовка остальных реагентов

РРО, К⁺, К⁻, хромоген готовы к применению

РРО перед использованием обязательно встряхнуть, так как при хранении возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.

Неиспользованные реагенты хранить в плотно закупоренных упаковках при температуре от 2 до 8°C, до истечения срока годности.

2. Проведение анализа

Протокол № 1 (18-часовая инкубация)

2.1. Вскрыть упаковку стрипов. Пластмассовым пинцетом осторожно поместить стрипы в канавки планшета маркированной стороной вверх.

2.2. Во все канавки планшета внести по 1 мл РРО, выдержать 3-5 мин при встряхивании на шейкере.

Внимание! Следить, чтобы при инкубациях и отмывках стрипы были полностью погружены в жидкость,

Использовать шейкер-качалку 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.

Во избежание перекрестной контаминации и перелива через бортики канавок, установить оптимальные параметры шейкера.

2.3. Отдельными наконечниками внести по 20 мкл контрольных образцов (К⁺, К⁻) и испытуемых образцов; маркером произвести разметку канавок планшета в зависимости от внесенного в них вида биологического материала.

Внимание! Внесение сывороток должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием автоматической пипеткой.

КОПИЯ ВЕРНА

подпись

Ген. директор
ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.



2.4. Заклеить занятые канавки липкой пленкой или закрыть пластиковой крышкой. Поместить планшет на шейкер и инкубировать 18 ч при температуре 18-25 °С.

Примечание.

За 5-10 мин до окончания первой инкубации приготовить рабочий отмывающий раствор (см. п. 1.1).

2.5. После инкубации используя автоматическую пипетку или вакуумный аспиратор удалить жидкость из канавок планшета, в ёмкость, содержащую дезинфицирующий раствор.

Внимание! *Соблюдать осторожность, чтобы при удалении растворов не выпали стрипы. Во избежание перекрестной контаминации наконечник отсасывающего устройства после каждого контакта с различными образцами сывороток промывать дистиллированной водой или использовать для каждого образца отдельный одноразовый наконечник. Следить, чтобы капли влаги не оставались под стрипом. При необходимости осторожно приподнимать стрипы пинцетом и удалять из-под них остатки влаги.*

2.6. Промыть стрипы 4 раза, внося во все канавки по 2,0 мл рабочего отмывающего раствора (см. п. 1.1). При первой промывке раствор удалить сразу же после внесения, при всех последующих промывках выдерживать стрипы в растворе 3-5 мин при встряхивании. Во время промывки следить, чтобы стрипы были полностью погружены в отмывающий раствор. Стрипы, между этапами промывки не должны пересыхать. Удаление отмывающего раствора производить с предосторожностями, указанными в п. 2.5.

2.7. Во все канавки планшета внести по 1,0 мл рабочего раствора конъюгата (п.1.2). Поместить планшет на шейкер. Инкубировать в течение 30 мин при температуре 18-25 °С.

2.8. После инкубации удалить жидкость из канавок планшета, как указано в п. 2.5.

2.9. Промыть стрипы, как указано в п.2.6.

Внимание! *Промывку и удаление жидкости после реакции с конъюгатом выполнять особенно аккуратно, т.к. даже небольшие следы конъюгата при контакте с хромогеном могут привести к неспецифическому окрашиванию всего стрипа, а не отдельных полос.*

2.10. Внести во все канавки по 1,0 мл хромогена. Инкубировать 15 мин в защищенном от света месте при температуре 18-25 °С при встряхивании на шейкере до появления на стрипе окрашенных полос.

2.11. По окончании инкубации удалить раствор хромогена и для остановки реакции промыть планшет 1 раз отмывающим раствором и 3 раза водой очищенной, внося во все канавки по 2,0мл воды.

2.12. Поместить стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги маркированной стороной вверх, положить в защищенное от света место до полного высыхания.

Сразу же после полного высыхания стрипов провести учет результатов.

Протокол № 2 (2-часовая инкубация)

Выполнить операции, описанные для протокола № 1 в п.п. 2.1-2.3.

В операции по п. 2.4 протокола № 1 заклеить занятые канавки липкой пленкой или закрыть крышкой. Поместить планшет на шейкер и инкубировать 2 ч при температуре 18-25 °С.

Выполнить операции, описанные для протокола № 1 в п.п. 2.5-2.6.

В операции по п. 2.7 протокола № 1 во все канавки планшета внести по 1,0 мл рабочего раствора конъюгата (п.1.2). Поместить планшет на шейкер. Инкубировать в течение 1 ч при температуре 18-25 °С.

Выполнить операции, описанные для протокола № 1 в п.п. 2.8-2.12.

КОПИЯ ВЕРНА

Зен. директор,
ЗАО "ЭКОЛЭБ"
Бершов В.Ю.



УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят при следующих условиях:

1. Контрольные образцы дали окрашивание полос стрипов строго в соответствии с требованиями, содержащимися в таблице 3.

Таблица 3

Контроль- ный образец	Полоски, соответствующие антигенам...						
	Env 160	Env 41	Gag 1	Pol 1	Env 2	КАГ	К _{реакции}
К-	-	-	-	-	-	-	+
К ⁺	+	+	+или-	+или-	+	-	+

2. На стрипе четко окрашена полоса контроля правильности проведения реакции (К_{реакции}) и не окрашена полоса контроля специфичности реакции (КАГ).

При несоблюдении хотя бы одного из этих условий исследование необходимо повторить заново.

Интерпретация результатов исследования

Результаты анализа образца	Окрашенная полоса в зоне						
	Env 160	Env 41	Gag 1	Pol 1	Env 2	КАГ	К _{реакции}
Положительный по ВИЧ-1	+	+	+ или -	+ или -	-	-	+
Положительный по ВИЧ-2	-	-	+ или -	+ или -	+	-	+
Неопределенный по ВИЧ-1	+	-	+ или -	+ или -	-	-	+
Неопределенный по ВИЧ-1	-	+	+ или -	+ или -	-	-	+
Неопределенный (возможно появление слабоокрашенных полос (±) для сывороток, не содержащих антитела к ВИЧ)	-	-	±	-	-	-	+
	-	-	-	±	-	-	+
Отрицательный	-	-	-	-	-	-	+

Примечания:

"-" – отсутствие окрашивания полосы,

"+" – окрашивание полосы любой интенсивности.

Окрашивание полосы контроля специфичности реакции КАГ обозначает, что образец дает неспецифические результаты исследования из-за наличия в нем большого количества антител к бактериальным антигенам или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения сывороток.

При неопределенном результате исследование необходимо повторить с образцом, полученным через 3-4 недели после первого исследования.

Внимание! Если неопределенный результат получен при постановке реакции по протоколу № 2, рекомендуется повторить исследование по протоколу № 1.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 1,5 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Набор транспортируют 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.


КОПИЯ ВЕРНА

подпись

Зен. Гаршиной
ЗАО Юслай
Берисов В.Ю.



По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в организацию-производитель ЗАО «ЭКОлаб» по адресу 142530; Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе  С.Р.Марданлы



КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ
(ИФА Лайн-Блот ВИЧ-1,2)

	Протокол анализа №1 18 часовая инкубация	Протокол анализа №2 2-х часовая инкубация
Внести	в канавки планшета по одному стрипу для каждого контрольного и исследуемого образца; в каждую канавку – по 1 мл РРО	в канавки планшета по одному стрипу для каждого контрольного и исследуемого образца; в каждую канавку – по 1 мл РРО
Инкубировать	3-5 мин, при 18-25 °С, на шейкере	3-5 мин, при 18-25 °С, на шейкере
Внести	по 20 мкл контрольных и исследуемых образцов	по 20 мкл контрольных и исследуемых образцов
Инкубировать	18 ч, при 18-25 °С, на шейкере	2 ч, при 18-25 °С, на шейкере
Промыть	4 раза по 2,0 мл ОР	4 раза по 2,0 мл ОР
Внести	в каждую канавку по 1,0 мл рабочего разведения конъюгата	в каждую канавку по 1,0 мл рабочего разведения конъюгата
Инкубировать	30 мин, 18-25 °С, на шейкере	1 ч, 18-25 °С, на шейкере
Промыть	4 раза по 2,0 мл ОР	4 раза по 2,0 мл ОР
Внести	в каждую канавку по 1,0 мл хромогена	в каждую канавку по 1,0 мл хромогена
Инкубировать	15 мин, 18-25 °С, на шейкере	15 мин, 18-25 °С, на шейкере
Промыть	1 раз ОР и 3 раза водой очищенной по 2,0 мл	1 раз ОР и 3 раза водой очищенной по 2,0 мл
Высушить стрипы между листов фильтровальной бумаги и зарегистрировать результаты проведенного исследования		

КОПИЯ ВЕРНА

Подпись

Зен. директор
ЗАО «ЭКОлаб»
Борисов В.Ю.

