

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к антигенам вирусов иммунодефицита человека первого и второго типов методом иммунного блоттинга с применением рекомбинантных вирусоспецифических полипептидов

"Блот-ВИЧ 1/2 + 0"

ФСР 2009/04019

Е-0111 БЛОТ-ВИЧ 1/2+0

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов "Блот-ВИЧ 1/2 + 0", далее по тексту - Набор, предназначен для подтверждения выявления антител к отдельным антигенам ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы 0 и ВИЧ-2 в сыворотке или плазме крови человека методом линейного иммуноанализа (иммунного блоттинга).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

На поверхности иммуносорбента - полосок нитроцеллюлозных мембран - в виде поперечных линий иммобилизованы очищенные рекомбинантные полипептиды - аналоги антигенов ВИЧ и контрольные антигены специфичности и правильности проведения реакции:

1) рекомбинантный антиген "Env1-160" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий аминокислотную последовательность протективного белка (β -галактозидазы *E.coli*) и антигенных детерминант гликопротеина gp160 ВИЧ-1;

2) рекомбинантный антиген "Env1-41" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и аминокислотную последовательность антигенных детерминант гликопротеина gp41 ВИЧ-1;

3) рекомбинантный антиген "Gag1" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и антигенных детерминант белков p24 и p17 ВИЧ-1;

4) рекомбинантный антиген "Pol1" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и антигенных детерминант белка полимеразы p51 ВИЧ-1;

5) рекомбинантный антиген "Int1" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и антигенных детерминант белка интегразы p31 ВИЧ-1;

6) рекомбинантный антиген "Env2" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и антигенных детерминант гликопротеинов gp110 и gp38 ВИЧ-2;

7) рекомбинантный антиген "Env0" представляет собой синтезированный в *E.coli* полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и аминокислотную последовательность антигенных детерминант белка оболочки ВИЧ-1 группы 0;

8) контрольный антиген специфичности реакции (K_{Ag}) представляет собой синтезированный в *E.coli* рекомбинантный полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и не содержащий антигенных детерминант ВИЧ.

9) контрольный антиген правильности проведения реакции (K_p) представляет собой сыворотку против IgG человека.

Положительный контрольный образец инактивированный K^+ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и не

содержащую антител к вирусу гепатита С, HBsAg. Инактивирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный К⁻ представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С, HBsAg и антигена р24 ВИЧ. Инактивирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин).

Анализируемые образцы инкубируют с иммуносорбентом в канавках **планшетов для проведения реакции**. Содержащиеся в образцах иммуноглобулины к вирусу иммунодефицита человека специфически взаимодействуют с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Контрольный антиген правильности проведения реакции связывается с иммуноглобулинами класса G, присутствующими в образцах сывороток. Контрольный антиген специфичности реакции выявит связывание с иммуносорбентом антител к протективному белку, если таковые неспецифические для данного анализа антитела будут присутствовать в исследуемом образце. После удаления несвязавшихся антител в канавки планшетов с мембранами добавляют конъюгат, который взаимодействует с комплексами антиген-антитело, образовавшимися на предыдущем этапе реакции. После отмывки несвязавшихся молекул конъюгата, мембраны выдерживают с индикаторным раствором, включающим субстрат и хромоген ТМБ. Содержащийся в конъюгате фермент катализирует разложение субстрата, приводящее к окрашиванию хромогена в фиолетово-синий цвет в области линий, содержащих иммобилизованные вирусоспецифические рекомбинантные антигены и контрольный антиген правильности проведения реакции. После остановки реакции результаты учитывают визуально по окрашиванию линий на полосках.

2.2. Состав набора

Набор выпускается в виде набора компонентов, упакованных в коробку:

Компонент набора	Количество	Описание
Иммуносорбент	24 мембраны 1 пробирка	Полоски нитроцеллюлозной мембраны белого цвета размером 40×4 мм, маркированные по верхнему краю цифрами, с выпуклыми поперечными линиями, на которых иммобилизованы антигены.
Положительный контрольный образец инактивированный K ⁺	0,25 мл 1 пробирка	Прозрачная или слегка опалесцирующая, жидкость розового цвета.
Отрицательный контрольный образец инактивированный K ⁻	0,25 мл 1 пробирка	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.
Конъюгат	От 0,5 до 2,0 мл 1 пробирка	Прозрачная жидкость светло-желтого цвета.
Концентрат раствора № 2 блокирующего	31 мл 1 флакон	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость; допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка, легко разбивающегося при встряхивании.
Раствор № 3 для разведения сывороток	25 мл 1 флакон	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость, допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка, легко разбивающегося при встряхивании.
Раствор № 4 для разведения хромогена	30 мл 1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость.
Хромоген	1,0 мл 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость.
Раствор № 6 для остановки реакции	25 мл 1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость.
Планшет для проведения реакции	2 или 3 шт.	Пластмассовый планшет с 12- или 8-канавками соответственно.

Набор рассчитан на проведение 24 анализов, включая контрольные.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Чувствительность

Чувствительность на «Стандартной панели сывороток, содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) в различных концентрациях» (ОСО 42-28-212-02П, ТУ 9398-027-26329720-2007, РУ № ФС 2007/00953), составляет 100%.

Чувствительность на «Стандартной панели сывороток, содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека второго типа (ВИЧ-2) в различных концентрациях» (ОСО 42-28-214-02, ТУ 9398-027-26329720-2007, РУ № ФС 2007/00953), составляет 100%.

3.2. Специфичность

Специфичность на «Стандартной панели сывороток, не содержащих антитела к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1,2) и антиген р24 ВИЧ-1» (ОСО 42-28-214-02П, ТУ 9398-027-26329720-2007, РУ № ФС 2007/00953), составляет 100%.

На линиях мембран с иммобилизованными антигенами ВИЧ при анализе сывороток стандартных панелей допускается окрашивание очень слабой интенсивности (+/-) в связи со слабой реактивностью отдельных сывороток стандартных панелей к отдельным рекомбинантным белкам ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все сточные растворы обрабатывать 4 %-м раствором хлорамина или 6 %-м раствором перекиси водорода при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 3 часов;
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при 121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м спиртом;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения анализа необходимо использовать:

- качающее устройство типа КУ-400, позволяющее производить качание с углом колебаний 2-10 градусов и частоте от 10 до 15 колебаний в минуту, или аналогичные ему;
- аспиратор вакуумный типа ОХВЗ-01-«Дубна»;
- дистиллятор типа АДЭ-25;
- пинцет пластмассовый;

- пипетки автоматические одноканальные («Gilson», Франция, P200, P1000, P5000) со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- цилиндры мерные вместимостью 10 мл и 200 мл;
- стаканы мерные вместимостью 10 мл и 200 мл;
- перчатки резиновые хирургические;
- чашка Петри (диаметр 100 мм);
- спирт этиловый;
- перекись водорода;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- одноразовая посуда для приготовления рабочих растворов конъюгата и хромогена.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме 20 мкл.

В наборе могут быть исследованы образцы, находящиеся в пробирках, содержащих цитрат натрия, гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянтов, а также образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием. Собранные образцы сыворотки или плазмы хранят при температуре от 4 °С до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше минус 15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Анализ проб следует проводить так, чтобы на одного оператора одновременно приходилось не более одного набора.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов (для проведения 8 анализов)

Перед началом работы используемые компоненты набора выдержите при комнатной температуре 30 мин. Неиспользованные компоненты после вскрытия внутренней упаковки храните при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности набора. Ванночки рекомендуется протереть 70 % спиртом и ополоснуть дистиллированной водой.

7.1.1. Приготовление рабочего раствора № 2

Концентрат раствора № 2 интенсивно встряхните, перенесите в мерную емкость 10 мл, доведите объем до метки 80 мл дистиллированной водой и перемешайте.

Готовый раствор храните не более 4 ч при температуре от 18 °С до 25 °С или 24 ч при температуре от 4 °С до 12 °С.

Если флакон с концентратом раствора № 2 содержит рыхлый комкующийся осадок, разбейте осадок встряхиванием до полного растворения.

7.1.2. Приготовление раствора № 3

Поставляется в готовом виде. Интенсивно взболтайте перед использованием!

7.1.3. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

Указанные в данном пункте объемы конъюгата относятся к наборам серии 63.

Отберите 0,9 мл¹ конъюгата в случае выдерживания образцов в течение 2 ч, либо 0,3 мл¹ конъюгата в случае выдерживания образцов в течение 18 ч, поместите в чистую посуду и добавьте 9 мл рабочего раствора № 2 (см. п. 7.1.1). Тщательно перемешайте.

Готовый раствор конъюгата храните не более 15 мин при температуре от 9 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.1.4. Приготовление индикаторного раствора.

Отберите 9 мл раствора № 4, поместите в чистую емкость и добавьте 0,2 мл хромогена. Тщательно перемешайте.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ!

Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с хромогеном, раствором № 4 и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе пероксидазной реакции. Избегайте также контакта этих реагентов с металлами.

¹ Объем отбираемого раствора индивидуален для каждой серии набора и указан в Инструкции, вкладываемой в наборы соответствующей серии.

7.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

Все операции с полосками нитроцеллюлозных мембран проводите с использованием пластмассового пинцета.

Обратите внимание, чтобы при инкубации и промывании полоски мембран были полностью погружены в жидкость, а реагенты не переливались через бортики канавок во избежание смешивания. После окончания отдельных стадий реакции и промывок все растворы необходимо тщательно удалять при помощи насоса или автоматической пипетки. Следите, чтобы капли влаги не оставались под мембраной. При необходимости осторожно приподнимите мембрану пинцетом и удалите из-под нее остатки влаги.

Обратите внимание, чтобы растворы не попадали внутрь пипетки.

Процедура проведения анализа с 2-часовой инкубацией с образцами.

7.2.1. Необходимое количество полосок мембран извлеките из пробирки и поместите по одной в каждую канавку планшета. Внесите в каждую канавку по 1 мл раствора № 3 так, чтобы мембраныгрузились в раствор. Поместите планшет на качалку и выдержите 10 мин при температуре от 20 °С до 25 °С при угле колебаний 2-10 градусов и частоте от 10 до 15 колебаний в минуту.

7.2.2. Не удаляя раствор, внесите в канавку планшета, предназначенную для исследования положительного контроля, 20 мкл K^+ , в канавку планшета, предназначенную для исследования отрицательного контроля, 20 мкл K^- . В остальные канавки внесите по 20 мкл испытуемых образцов сывороток или плазмы крови. При внесении каждого (исследуемого и контрольного) образца необходимо регистрировать в протоколе анализа номер соответствующей полоски мембраны.

Каждую пробу вносите в соответствующую канавку планшета новым наконечником. Внесение образцов сывороток должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием автоматической пипеткой.

Заклейте занятые канавки липкой пленкой и поместите планшет с мембранами на качалку. Выдержите 2 ч при температуре от 20 °С до 25 °С, покачивая планшет, как описано в п.7.2.1.

7.2.3. Удалите жидкость из канавок планшета (с этой целью здесь и далее используйте лабораторный вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку). Внесите в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, после чего раствор сразу удалите.

7.2.4. Внесите в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, выдержите 5 мин, раствор удалите. Операцию повторите.

7.2.5. Внесите в каждую канавку по 1 мл рабочего разведения конъюгата, предписанного для 2-часовой длительности инкубации (см. п.7.1.3). Выдержите 1 ч при температуре от 20 °С до 25 °С, покачивая планшет, как описано в п.7.2.1.

7.2.6. Раствор конъюгата удалите. Внесите в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2 (см. п.7.1.1), раствор сразу удалите.

Промывки и удаление жидкости после реакции с конъюгатом требуют особого внимания, т.к. даже следы конъюгата при контакте с субстратом могут привести к неспецифическому окрашиванию всей мембраны, а не отдельных полос.

7.2.7. Внесите в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, выдержите 5 мин, жидкость удалите. Операцию повторите.

7.2.8. Быстро промойте мембраны дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку по 1 мл и сразу же удаляя. После промывки всех мембран тщательно удалите из канавок остатки воды.

7.2.9. Внесите в каждую канавку по 1 мл свежеприготовленного индикаторного раствора (см. п.7.1.4). Выдержите, покачивая планшет (см. п.7.2.1), 15 мин при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте (например, накрыв планшет крышкой). Жидкость удалите.

7.2.10. Внесите в каждую канавку по 1 мл раствора № 6, выдержите 5 мин. Раствор удалите. Дважды тщательно промойте мембраны дистиллированной водой объемом не менее 2 мл.

7.2.11. Положите полоски мембран на лист фильтровальной бумаги и, не промокая их, поместите в защищенное от света место до полного высыхания. Учет результатов следует проводить сразу же после полного высыхания мембран.

Процедура проведения анализа с 18-часовой инкубацией с образцами.

В этом более чувствительном варианте исследования измените только следующие параметры проведения реакции:

а) Исследуемые и контрольные образцы вносите так же, как описано в п.7.2.2, но **увеличьте** длительность инкубации до 18-20 часов;

б) Вносите в каждую канавку по 1 мл рабочего разведения конъюгата, **предписанного для 18-часовой длительности инкубации (см. п.7.1.3)**. Выдержите **30 мин** при температуре от 20 до 25 °С, покачивая планшет, как описано в п.7.2.1.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

8.1. Убедитесь, что в результате проведения реакции контрольные сыворотки (K⁺ и K⁻) дают фиолетово-синее окрашивание в области линий на полосках мембран (рис. 1) строго в соответствии с Таблицей 1.

Рис 1. Размещение линий с иммобилизованными вирусоспецифическими и контрольными антигенами на полоске нитроцеллюлозной мембраны.

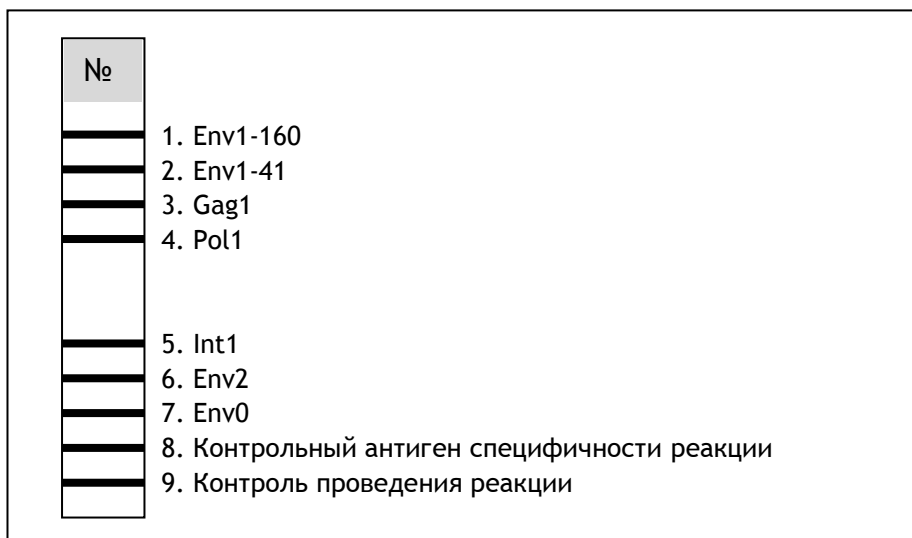


Таблица 1. Окрашивание линий на полосках мембран при анализе контрольных образцов (K⁺ и K⁻).

СЫВОРОТКА	Номера линий								
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
K ⁺	есть	есть	есть	есть	есть	есть	есть	нет	есть
K ⁻	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	есть

В случае **любого** отличия результатов анализа K⁺ и K⁻ от приведенных в табл. 1 исследование считается выполненным некорректно и его следует повторить.

8.2. ЕСЛИ на полоске мембраны с исследуемым образцом не произошло окрашивания линии № 8 (контроль специфичности реакции) и произошло окрашивание линии № 9 (контроль правильности проведения реакции) то интерпретацию результата анализа данного образца проводите в соответствии с табл. 2.

Если при этом исследование проводилось по варианту с двухчасовой инкубацией образцов и произошло столь слабое окрашивание вирусоспецифических линий мембраны, что оно не дает возможности интерпретировать результат как положительный, учитывайте результат как неопределенный, а анализ такой сыворотки повторите по схеме с увеличенным временем инкубации в соответствии с п.7.2.12.

Таблица 2. Интерпретация возможных результатов исследования.

ЛИНИЯ АНТИГЕНА									Результат исследования образца учитывайте как:
№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	
Env1-160	Env1-41	Gag1	Pol1	Int1	Env2	Env0	K _{Ag}	K _P	
+	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)*	-	+	положительный по ВИЧ-1
-	-	(+)*	(+)*	(+)*	+	-	-	+	положительный по ВИЧ-2
+	(+)*	(+)*	(+)*	(+)*	-	+	-	+	положительный по ВИЧ-0**
+	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)*	-	+	положительный по ВИЧ-1 и ВИЧ-2
-	-	+	(+)	(+)	-	-	-	+	неопределенный
-	-	(+)	+	(+)	-	-	-	+	
-	-	(+)	(+)	+	-	-	-	+	
-	-	-	-	-	-	-	-	+	отрицательный

+ - любое по интенсивности окрашивание линии.

- - отсутствие окрашивания.

(+) - наличие либо отсутствие окрашивания. На интерпретацию не влияет.

(+)* - наличие окрашивания возможно из-за иммунологической перекрестной реакции.

** - данный вариант интерпретации следует выбрать вместо варианта «положительный по ВИЧ-1», если интенсивность окрашивания полосы №7 выше интенсивности окрашивания полос № 1 и № 2.

8.3. Если произошло окрашивание полосы № 8, то это означает, что образец дает неспецифическую реакцию (из-за наличия большого количества антител к бактериальным антигенам или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения сывороток).

Результат окрашивания любой из полос с антигенами (полосы №№ 1-7) следует обозначить как "+", если интенсивность окраски заметно превышает интенсивность окрашивания полосы № 8. После этого результат анализа учитывайте в соответствии с табл. 2.

При одинаковой или менее выраженной интенсивности окрашивания всех антигеносодержащих полос (с № 1 по № 7) в сравнении с полосой № 8 результат анализа учитывайте как неопределенный.

8.4. Если на полоске мембраны с исследуемым образцом не произошло четкого окрашивания полосы № 9, то результат не учитывайте. Исследование тестируемого образца повторите.

8.5. При получении неопределенного результата рекомендуется повторное взятие крови через 3-4 недели и новое исследование на появление антител к антигенам ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

Примечание: В случае исследования сывороток стандартных панелей ОСО 42028-212-02П и ОСО 42028-214-02 результаты учитывайте в соответствии с паспортом на использованную серию стандартной панели. Допускается окрашивание линий на отдельных полосках мембран с очень слабой интенсивностью в связи со слабой реактивностью сывороток стандартных панелей.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°С до 8°С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9°С до 30°С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждениях.

ДЛЯ ЗАМЕТОК