УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

_____ В.Е.Шевчук
"22" 01 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА

Блот-HIV 1,2+0

СП ООО "Фармлэнд",
Генеральный директор

_____ В.В.Голынников
"20" 01 2009 г.

КОПИЯ ВЕРНА
Декларация №4 от 07.03.19
Ельцер Ю.В.

2009

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для подтверждения наличия антител к отдельным антигенам вируса иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и ВИЧ-1 группы 0 в сыворотке или плазме крови человека “in vitro” методом иммунного блоттинга.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 пробирка, 24 мембраны
Положительный контрольный образец ($К^+$)	1 пробирка, 0,25 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$)	1 пробирка, 0,25 мл
Конъюгат (Кг)	1 пробирка, от 0,5 до 2,0 мл
Концентрат блокирующего раствора (КБР)	1 флакон, 31 мл
Раствор для разведения сывороток (РР-С)	1 флакон, 25 мл
Раствор для разведения хромогена (РР-Х)	1 флакон, 30 мл
Хромоген ТМБ	1 флакон, 1,0 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 25 мл
Планшет для проведения реакции	2 или 3 планшета

2.2 Основные компоненты набора " Блот-HIV 1,2+0" – иммуносорбент и конъюгат.

Иммуносорбент представляет собой полоски нитроцеллюлозной мембраны белого цвета, маркированные по верхнему краю цифрами, с выпуклыми поперечными линиями, на которых 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 аминокислотную последовательность протективного белка (β-галактозидазы E.coli) и аминокислотную последовательность антигенных детерминант гликопротеина gp41 ВИЧ-1;

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

4) рекомбинантный антиген "Po11" представляет собой синтезированный в E.coli полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и антигенных детерминант белка полимеразы p51 ВИЧ-1;

ПОЛЕЗНО ЗЕРНА
Декларация № 6/19
от 09.03.19 Сельхозпищепром

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 аминокислотную последовательность протективного белка и аминокислотную последовательность антигенных детерминант белка оболочки ВИЧ-1 группы 0;

8) контрольный антиген специфичности реакции ($К_{Аг}$) 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 ($К_р$) представляет собой сыворотку против IgG человека.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Положительный контрольный образец – сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, не содержащая антитела к вирусу гепатита С и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антиген p24 ВИЧ-1 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

При инкубации образцов сыворотки (плазмы) крови человека в канавках планшета для проведения реакции ВИЧ-специфические антитела связываются с рекомбинантными антигенами на мембране иммуносорбента, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Контрольный антиген правильности проведения реакции связывается с IgG, 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 и исследуемом образце. После отмывания несвязавшихся антител в канавки планшетов с мембранами иммуносорбента вносят конъюгат, который в свою очередь, связывается со специфическими иммунными комплексами антиген-антитело, образовавшимися на предыдущем этапе реакции. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена 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.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и визуально по окрашиванию линий на мембране иммуносорбента определяют наличие или отсутствие антител к ВИЧ-1,2+0.

КОПИЯ ВЕРНА
реф. № 01/11 от 07.03.19
Ю.В. 20 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки (плазмы) крови человека. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение на проведение **3** постановок иммунного блоттинга: 1 постановка – 8 мембран. Всего – **24** определения, включая контрольные образцы.

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.3 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.4 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

4 Правила работы с набором

4.1 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.

4.2 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение 15 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Образцы сывороток можно хранить при температуре (4-6) °С до 72 ч. Замороженные образцы (желательно до температуры не менее минус 15 °С) можно хранить до 3 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным ростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;

- всю используемую для приготовления реагентов посуду не обрабатывать дезрастворами и моющими средствами. В случае необходимости промыть водой питьевой проточной, а затем пять раз ополоснуть дистиллированной водой;

- для работы с хромогеном ТМБ и РХ необходимо использовать отдельные емкости для растворов, наконечники для пипеток, посуду.

- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;

- необходимо использовать пипетки автоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором с объемной долей спирта этилового 70 %. Не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;

- для работы с исследуемыми образцами сыворотки (плазмы) крови человека и контрольными образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. Каждый образец сыворотки (плазмы), а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Качающее устройство типа «КУ 400» (ООО НПФ «Иммедтех», Россия), позволяющее производить качание с углом колебаний (2-10) ° и частоте (10-15) колебаний в минуту, или аналогичное ему по характеристикам;

- отсасыватель хирургический вакуумный типа ОХВ 3-01 "Дубна" (ООО НПФ «Иммедтех», Россия) или аналогичный ему по характеристикам;

- пипетки одноканальные автоматические («Ленпипет», Россия) со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 мл до 5,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%) или аналогичные им по характеристикам;

- цилиндры мерные вместимостью 25 мл, 50 мл и 250 мл;

- флаконы стеклянные вместимостью 30 мл;

- пинцет пластмассовый;

- клейкая пленка для заклеивания планшетов;

- одноразовая посуда для приготовления раствора Кг в рабочем разведении и рабочего раствора субстрата;

- чашка Петри (диаметр 100 мм);

- вата медицинская гигроскопическая;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые хирургические;

- спирт этиловый;

- перекись водорода;

- вода дистиллированная;

- контейнер для сбора твердых отходов;

- контейнер для слива отработанных жидкостей;

Республика Беларусь Белорусско-германское совместное общество с ограниченной ответственностью предприятие «ФАРМЛЭНД» Для документов г. Несвиж

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток (плазмы) и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

Планшеты для проведения реакции протереть спиртом и ополоснуть дистиллированной водой.

Расход реагентов набора для постановки анализа, который определяется количеством используемых полосок мембран иммуносорбента, приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Расход реагентов набора для постановки анализа

Объем реагента, мл	Количество используемых полосок иммуносорбента, шт.					
	8		16		24	
Приготовление раствора для промывания планшета						
КБР	**10**		**20**		**30**	
Дистиллированная вода	**до 80**		**до 160**		**до 240**	
Приготовление раствора Кг в рабочем разведении						
Раствор для промывания планшета	**9**		**18**		**27**	
Кг	**а*/3**	**а**/3**	**2/3а***	**2/3а****	**а***	**а****
Приготовление рабочего раствора субстрата						
РР-Х	**9**		**18**		**27**	
Хромоген ТМБ	**0,2**		**0,4**		**0,6**	

а* – объем конъюгата для проведения анализа с 2-часовой инкубацией с образцами = Х мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
а** – объем конъюгата для проведения анализа с 18-часовой инкубацией с образцами = Х мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета

Внимание! Раствор для промывания планшета готовить за 15 мин до начала проведения анализа!

Если флакон с КБР содержит рыхлый комкующийся осадок, то содержимое флакона необходимо тщательно встряхнуть и перемешать до полного растворения осадка.

Содержимое флакона с КБР интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. В мерный цилиндр вместимостью 250 мл внести 30 мл КБР, затем добавить дистиллированной воды до метки 240 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования 8-ми или 16-ти полосок мембран иммуносорбента содержимое флакона с КБР интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимый объем раствора (таблица 1) в мерный стакан или цилиндр, добавить необ-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ходимое количество дистиллированной воды и перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор для промывания планшета можно хранить не более 4 ч при температуре (18-25) °С или 24 ч при температуре (9-12) °С. Неиспользованный КБР можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.3 Подготовка иммуносорбента, $К^+$, $К^-$, РР-С, РР-Х и стоп-реагента

Иммуносорбент, $К^+$, $К^-$, РР-С, РР-Х и стоп-реагент готовы к использованию.

Внимание! Во флаконе с РР-С возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка. Перед использованием содержимое флакона тщательно встряхнуть и перемешать, не допуская образования пены.

Перед использованием содержимое пробирок с $К^+$ и $К^-$ необходимо встряхнуть.

Неиспользованные РР-С, РР-Х и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Остаток $К^+$ и $К^-$ после вскрытия флакона можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.4 Приготовление раствора Кг в рабочем разведении

В **чистый** флакон отобрать 27 мл раствора для промывания планшета (п.6.2), добавить указанный в таблице 1 объем Кг. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования 8-ми или 16-ти полосок мембран иммуносорбента в **чистый** флакон отобрать необходимое количество раствора для промывания планшета (п.6.2), добавить Кг в соответствии с таблицей 1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Раствор Кг в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор Кг в рабочем разведении можно хранить в течение 15 мин при температуре (18-25) °С в **защищенном от света месте**! Использовать для приготовления раствора Кг в рабочем разведении только новую одноразовую посуду и новые наконечники!

Остаток Кг можно хранить в закрытой пробирке при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.5 Приготовление рабочего раствора субстрата

В чистый флакон отобрать 27 мл РР-Х, добавить 0,6 мл (600 мкл) хромогена ТМБ. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования 8-ми или 16-ти полосок мембран иммуносорбента в **чистый** флакон из темного стекла или пластика (прозрачный флакон обернуть флакон) отобрать необходимое количество РР-Х, добавить хромоген ТМБ в соответствии с таблицей 1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Рабочий раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор хранению не подлежит!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор субстрата должен быть бес-

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором субстрата, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники!

Остаток хромогена ТМБ можно хранить в закрытой пробирке при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

7 Требования к проведению реакции

7.1 Все операции с полосками иммуносорбента рекомендуется проводить с использованием пластмассового пинцета.

7.2 Промывание и инкубацию полосок иммуносорбента с образцами сыворотки (плазмы) крови человека и реагентами проводить, аккуратно покачивая планшеты на автоматическом качающем устройстве при угле колебаний (2-10) ° и частоте (10-15) колебаний в минуту;

- необходимо обратить внимание на то, чтобы при каждой инкубации и промывании все полоски иммуносорбента были полностью погружены в раствор, без переполнения и перетекания жидкости через бортики канавок во избежание смешивания растворов;
- после окончания отдельных стадий реакции и промывок удаление всех жидких реагентов из канавок планшета проводить при помощи насоса или автоматической пипетки или вакуумного отсасывателя;
- необходимо следить, чтобы капли влаги не оставались под полоской иммуносорбента. При необходимости осторожно приподнять полоску иммуносорбента пинцетом и удалить из-под нее остатки влаги;
- некачественное промывание полосок иммуносорбента приводит к получению некорректных результатов;
- необходимо обратить внимание на то, чтобы растворы не попадали внутрь пипетки.

8 Проведение анализа

8.1 Проведение анализа с 2-часовой инкубацией с образцами

8.1.1 Необходимое количество полосок иммуносорбента аккуратно извлечь из пробирки и поместить по одной в каждую канавку планшетов. Контрольным образцам и исследумым образцам сывороток (плазмы) крови человека присвоить регистрационные номера, соответствующие номерам полосок иммуносорбента.

8.1.2 В каждую канавку планшетов внести по 1,0 мл РР-С так чтобы полоски иммуносорбента погрузились в раствор.

Поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в течение **10 мин** при угле колебаний (2-10) ° и частоте (10-15) колебаний в минуту.

8.1.3 Не удаляя РР-С, в отдельные канавки планшетов внести по 0,02 мл (20 мкл) $К^+$, $К^-$ и образцов исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови человека.

Внимание! Каждый образец необходимо вносить в соответствующую канавку планшета новым наконечником! Внесение образцов должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием полуавтоматической пипеткой.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.1.4 Заклеить занятые канавки планшетов клейкой пленкой, поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в течение **2 ч**.

8.1.5 Удалить жидкость из канавок планшетов, используя вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку. Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2) и сразу же удалить раствор.

Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2), поместить планшеты на качающее устройство, выдержать 5 мин и удалить раствор. Операцию повторить 1 раз.

8.1.6 В каждую канавку планшетов внести по 1,0 мл раствора Кг в рабочем разведении (п 6.4), поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в течение **1 ч**.

8.1.7 Удалить жидкость из канавок планшетов, используя вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку. Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2) и сразу же удалить раствор.

Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2), поместить планшеты на качающее устройство, выдержать 5 мин и удалить раствор. Операцию повторить 1 раз.

Внимание! Промывание полосок иммуносорбента и удаление растворов после реакции с конъюгатом требует особого внимания, т.к. даже следы конъюгата при контакте при контакте с субстратом могут привести к неспецифическому окрашиванию всей полоски иммуносорбентом, а не отдельных полос.

8.1.8 Быстро промыть полоски мембран иммуносорбента дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку планшетов по 1,0 мл воды и сразу же удаляя ее. После промывания всех полосок иммуносорбента тщательно удалить из канавок планшетов остатки воды.

8.1.9 В каждую канавку планшетов внести по 1,0 мл **свежеприготовленного** рабочего раствора субстрата (п 6.5), поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в защищенном от света месте в течение **15 мин**.

8.1.10 Удалить раствор из канавок планшетов. Внести в каждую канавку по 1,0 мл стоп-реагента, выдержать 5 мин и удалить раствор.

8.1.11 Промыть полоски мембран иммуносорбента дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку планшетов по 2,0 мл воды и сразу же удаляя ее. Операцию повторить 1 раз. После промывания всех полосок иммуносорбента тщательно удалить из канавок планшетов остатки воды.

8.1.12 Полоски иммуносорбента осторожно извлечь из канавок планшета, положить на лист фильтровальной бумаги и, не промокая их, поместить в защищенное от света место до полного высыхания.

8.1.13 Обработку результатов анализа провести сразу же после полного высыхания полосок мембран иммуносорбента.

8.2 Проведение анализа с 18-часовой инкубацией с образцами

8.2.1 Необходимое количество полосок иммуносорбента аккуратно извлечь из пробирки и поместить по одной в каждую канавку планшетов. Контрольным образ-

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цам и исследумым образцам сывороток (плазмы) крови человека присвоить регистрационные номера, соответствующие номерам полосок иммуносорбента.

8.2.2 В каждую канавку планшетов внести по 1,0 мл РР-С так чтобы полоски иммуносорбента погрузились в раствор.

Поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в течение **10 мин** при угле колебаний (2-10) ° и частоте (10-15) колебаний в минуту.

8.2.3 Не удаляя РР-С, в отдельные канавки планшетов внести по 0,02 мл (20 мкл) $К^+$, $К^-$ и образцов исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови человека.

Внимание! Каждый образец необходимо вносить в соответствующую канавку планшета новым наконечником! Внесение образцов должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием полуавтоматической пипеткой.

8.2.4 Заклеить занятые канавки планшетов клейкой пленкой, поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в течение **(18-20) ч.**

8.2.5 Удалить жидкость из канавок планшетов, используя вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку. Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2) и сразу же удалить раствор.

Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2), поместить планшеты на качающее устройство, выдержать 5 мин и удалить раствор. Операцию повторить 1 раз.

8.2.6 В каждую канавку планшетов внести по 1,0 мл раствора Кг в рабочем разведении (п 6.4), поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в течение **30 мин.**

8.2.7 Удалить жидкость из канавок планшетов, используя вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку. Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2) и сразу же удалить раствор.

Внести в каждую канавку по 1,0 мл раствора для промывания планшета (п.6.2), поместить планшеты на качающее устройство, выдержать 5 мин и удалить раствор. Операцию повторить 1 раз.

Внимание! Промывание полосок иммуносорбента и удаление растворов после реакции с конъюгатом требует особого внимания, т.к. даже следы конъюгата при контакте при контакте с субстратом могут привести к неспецифическому окрашиванию всей полоски иммуносорбентом, а не отдельных полос.

8.2.8 Быстро промыть полоски мембран иммуносорбента дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку планшетов по 1,0 мл воды и сразу же удаляя ее. После промывания всех полосок иммуносорбента тщательно удалить из канавок планшетов остатки воды.

8.2.9 В каждую канавку планшетов внести по 1,0 мл **свежеприготовленного** рабочего раствора субстрата (п 6.5), поместить планшеты на качающее устройство и инкубировать при температуре **(20-25) °С** в защищенном от света месте в течение **15 мин.**

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2.10 Удалить раствор из канавок планшетов. Внести в каждую канавку по 1,0 мл стоп-реагента, выдержать 5 мин и удалить раствор.

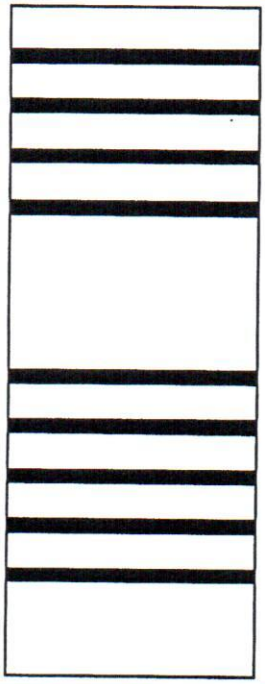
8.2.11 Промыть полоски мембран иммуносорбента дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку планшетов по 2,0 мл воды и сразу же удаляя ее. Операцию повторить 1 раз. После промывания всех полосок иммуносорбента тщательно удалить из канавок планшетов остатки воды.

8.2.12 Полоски иммуносорбента осторожно извлечь из канавок планшета, положить на лист фильтровальной бумаги и, не промокая их, поместить в защищенное от света место до полного высыхания.

8.2.13 Обработку результатов анализа провести сразу же после полного высыхания полосок мембран иммуносорбента.

9 Обработка результатов анализа

9.1 Расположение линий с иммобилизованными вирусоспецифическими и контрольными антигенами на полоске иммуносорбента показано на рисунке 1.



1 Env1-160
2 Env1-41
3 Gag 1
4 Pol 1
5 Int 1
6 Env 2
7 Env 0
8 Контрольный антиген специфичности реакции (КАг)
9 Контроль проведения реакции ($К_Р$)

Рисунок 1 – Расположение линий с иммобилизованными вирусоспецифическими и контрольными антигенами на полоске иммуносорбента

9.2 В результате проведения анализа с контрольными образцами линии на полосках иммуносорбента должны окраситься в фиолетово-синий цвет.

9.3 Результаты анализа учитывать только в том случае, если линии на полосках иммуносорбента при проведения анализа с контрольными образцами окрашены строго в соответствии с таблицей 2.

КОПИЯ ВЕРНА
07.03.19

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2 – Окрашивание линий на полосках иммуносорбента при анализе контрольных образцов

Контрольный образец	Номер линии на полосках иммуносорбента/окрашивание линии								
	№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 контрольных образцов от приведенных в таблице 2, анализ считается выполненным некорректно и его следует повторить.

9.4 При соблюдении выше перечисленных условий провести обработку результатов анализа каждого образца сыворотки (плазмы) крови человека.

9.5 Если на полоске иммуносорбента с исследуемым образцом сыворотки (плазмы) крови человека **не произошло** окрашивание линии **№8** (контроль специфичности реакции) и произошло окрашивание линии **№9** (контроль правильности проведения реакции), то интерпретацию результата анализа данного образца провести в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Интерпретация возможных результатов анализа

Номер линии на полосках мембран иммуносорбента/ наименование антигена									Результат анализа образца учитывать как:
№1 Env1 -160	№2 Env1 -41	№3 Gag1	№4 Pol1	№5 Int1	№6 Env2	№7 Env0	№8 K_{Ar}	№9 K_p	
+	+	(+)	(+)	(+)	—	(+)*	—	+	положительный по ВИЧ-1
—	—	(+)*	(+)*	(+)*	+	—	—	+	положительный по ВИЧ-2
+	(+)*	(+)*	(+)*	(+)*	—	+	—	+	положительный по ВИЧ-0**
+	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)*	—	+	положительный по ВИЧ-1 и по ВИЧ-2
—	—	+	(+)	(+)	—	—	—	+	неопределенный
—	—	(+)	+	(+)	—	—	—	+	
—	—	(+)	(+)	+	—	—	—	+	
—	—	—	—	—	—	—	—	+	отрицательный по ВИЧ

Примечания

1 + – любое по интенсивности окрашивание линии.

2 — – отсутствие окрашивания.

3 (+) – наличие либо отсутствие окрашивания; на интерпретацию результата не влияет.

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

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

Если при этом анализ проводился по варианту с 2-часовой инкубацией образцов сывороток (плазмы) крови человека и произошло столь слабое окрашивание ви-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

русоспецифических **линий** полосок иммуносорбента, что оно не дает возможности интерпретировать результат как положительный, следует учитывать результат как неопределенный, а анализ такого образца сыворотки (плазмы) крови человека повторить по варианту с 18-часовой инкубацией образцов (п.3.2).

9.6 Если на полоске иммуносорбента с исследуемым образцом сыворотки (плазмы) крови человека **произошло** окрашивание линии **№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 данного образца учитывать в соответствии с таблицей 3.

При одинаковой или менее выраженной интенсивности окрашивания всех полос с антигенами (полосы №№ 1-7) в сравнении с полосой №8 результат анализа учитывать как неопределенный.

9.7 Если на полоске иммуносорбента **не произошло** четкого окрашивания полосы **№9**, то результат анализа не учитывать. Исследование тестируемого образца следует повторить.

9.8 При получении неопределенного результата рекомендуется повторное взятие крови через (3-4) недели и проведение нового исследования на появление антител к антигенам ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

10 Условия хранения и применения набора

10.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Запрещается замораживать компоненты набора.

10.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

Библиография

[1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь

[2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы

[4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд» Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам И.М.Богдановской

Белорусско-голландское совместное предприятие с ограниченной ответственностью «ФАРМЛЭНД» Для документов Республика Беларусь г. Несвиж

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

_____А.С.Романенков
"24" 01 2004 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА

Блот-HIV 1,2+0

Республика Беларусь
Белорусско-голландское совместное предприятие общество с ограниченной ответственностью
«ФАРМЛЭНД»
Для документов
г. Несвиж

2004

КОПИЯ ВЕРНА
Дир. № 8 от 07.03.19
Сенчук Ю.В.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru