

ヒト免疫不全症ウイルス1抗体確認キット

ラブ ブロット 1

(NEW LAV BLOT 1)

使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。
また、必要な時に読めるように保管しておいてください。

■ 全般的な注意

1. 本品は、体外診断用医薬品ですので、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 添付文書に記載の使用方法に従ってください。それ以外の使用で得られたデータについては保証を致しかねます。
3. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
4. 陰性コントロール血清(R3)、陽性コントロール血清(R4)には、ヒト由来成分が含まれており、感染の危険がありますので感染性のあるものとして取り扱ってください。
5. 陰性コントロール血清(R3)、陽性コントロール血清(R4)及び酵素標識抗体(R5)には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれています。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
6. 使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。

* ■ 形状・構造等(キットの構成)

ラベル	試薬	性状	規格	主要成分
R1	HIV-1ウイルス蛋白質含有ニトロセルロース膜片	ストリップ	18枚 (6枚×3トレイ)	不活化HIV-1抗原転写膜
R2	洗浄液(原液)	液状	1本(100mL)	トリス緩衝液
R3	陰性コントロール血清	液状	1本(0.2mL)	HIV抗体陰性ヒト血清
R4	陽性コントロール血清	液状	1本(0.2mL)	不活化HIV-1抗体含有ヒト血清
R5	酵素標識抗体	液状	1本(40mL)	アルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体(ヤギ)
R6	発色剤	液状	1本(40mL)	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリールリン酸、ニトロブルーテトラゾリウム

■ 使用目的

血清中のHIV-1抗体の確認

■ 測定原理

ウエスタンブロット法

** ■ 操作上の注意

1. 測定検体の性質、採取法

1. 本品による測定は、血清を使用してください。
2. 7日以内に検査を実施する場合は、2~8℃保存が可能です。それ以外の場合は-20℃以下で保存してください。但し、凍結融解の繰り返しは避けてください。
3. フィブリン等の凝集塊が著しい検体は、遠心して除去してから使用してください。
4. 検体の微生物汚染、著しい溶血、高脂血清は、結果に影響がみられる場合がありますので、使用しないでください。
5. 冷蔵または凍結保存されていた検体は、室温に戻し、よく混和してから使用してください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

検体にヘモグロビン、トリグリセリド、ビリルビン、アルブミンを添加して試験した結果、それぞれ1000mg/dL、3600mg/dL、10mg/dL、9000mg/dLまで結果に対する影響は認められませんでした。

3. 操作上の留意事項

- 1) ニトロセルロース膜は素手で触れないでください。よく洗浄したピンセット(プラスチック製)などを使用してください。
- 2) 陽性コントロール血清は発色バンドの確認のため、必ず毎回使用してください。
- 3) 反応終了後のニトロセルロース膜は、自然乾燥後、保存することが可能ですが、熱・光・湿気を避けるようにしてください。なお長期保存する場合は、写真にして保存することをおすすめします。
- 4) 測定中にニトロセルロース膜を10分以上乾燥させないでください。
- 5) 発色剤(R6)に析出物が見られた場合は、沈殿させた後、ピペッティングしてください。析出物は、試験には影響を及ぼしません。

** ■ 用法・用量(操作方法)

試薬は室温に戻してから使用してください。

1. 試薬の調製法

ラベル	試薬	調製法	有効期限
R1	HIV-1ウイルス蛋白質含有ニトロセルロース膜片	検体数に応じて必要数のニトロセルロース膜を取り出し、残りは密封保存します。	ラベルに表示された使用期限(2~8℃に保存した場合)
R2	洗浄液(原液)	精製水で5倍希釈して使用します。	調製後1ヵ月(密封し2~8℃に保存した場合)
R3 R4 R5 R6	陰性コントロール血清 陽性コントロール血清 酵素標識抗体 発色剤	測定法に従って、そのまま使用します。	ラベルに表示された使用期限(2~8℃に保存した場合)

2. 必要な器具・試薬

- 1) 精製水
- 2) マイクロピペット(20μL)
- 3) ピペット(2mL)
- 4) メスシリンダー(100~500mL)
- 5) 振とう器
- 6) 使い捨て手袋
- 7) 吸引ポンプ(アスピレーター)
- 8) 次亜塩素酸ナトリウム液
- 9) ピンセット(プラスチック製)
- 10) 吸水紙

3. 測定操作法

- 1) 測定順に検体を並べます。
- 2) 洗浄液(原液)(R2)を精製水で5倍に希釈調製します。
- 3) 検体数に応じて必要な枚数のニトロセルロース膜(R1)をピンセット(プラスチック製)にて取り出します。残りはそのままパラフィルム等でシールし、保存することができます。また、添付トレイの代わりに市販トレイを用いることも可能です。
- 4) 調製済の洗浄液2mLを各トレイに添加し、5分間、振とう器でニトロセルロース膜を親和します。
- 5) ニトロセルロース膜上での反応(検体とウイルス蛋白の反応)
 - ① 検体、陽性コントロール血清(R4)、陰性コントロール血清(R3)のおのおの20μLをトレイに添加します。
 - ② 18~22℃、2時間、振とう器を用いてインキュベーションさせます(4℃による一昼夜反応も可能です)。
- 6) ニトロセルロース膜の洗浄
 - ① トレイの内容物を吸引除去します。
 - ② 調製済の洗浄液2mLを、再度各トレイに添加します。
 - ③ 18~22℃、5分間、振とう器で洗浄します。
 - ④ 内容物を吸引除去し、再度、調製済の洗浄液2mLを添加します。同様の洗浄操作を合計3回実施します。吸引はアスピレーターを用いてください。振とう器はニトロセルロース膜がゆっくりトレイ内で動くように調整してください。また

振とう器の蓋の開閉は、内容物が飛散しないように注意してください。

- 7) 酵素標識抗体の反応
 - ① 酵素標識抗体 (R5) 2mLを、トレイに添加します。
 - ② 18～22℃、1時間、振とう器を用いてインキュベーションさせます。
- 8) 6)と同様の洗浄操作を実施します。
- 9) 発色剤 (R6) 2mLを、トレイに添加します。
バンドが出現するまで(18～22℃、約5分間)、反応させます。
バンドが不鮮明な場合は、十分な発色が確認できるまで5分間以上、発色させてください。また、過染色を防ぐために、バンドの出現を注意深く観察することが大切です。
- 10) 内容物を吸引除去し、精製水2mLで約30秒間洗浄します。同様の洗浄操作を合計3回実施します。
- 11) ニトロセルロース膜を吸水紙に挟んで水分をとり、自然乾燥させます。
- 12) コントロールバンドが強く発色していることを確認した後、陽性コントロール血清のバンドと比較し、判定します。

4. 測定系の確認

ニトロセルロース膜の、番号のついていない方の端 (P18/17バンドの下) には、コントロールバンドとして抗ヒトIgG抗体がブロットされており、このバンドの発色により検体及び試薬の分注が適切に行われたかどうか、確認することができます。

** ■ 測定結果の判定法

1. 判定基準

HIV-1抗体が存在した場合はニトロセルロース膜にバンド (青紫色) が出現します。このバンドの位置は各構成蛋白の分子量により分かれています。ウイルスの各構成蛋白は次表のとおりです。

名称	遺伝子	性質	WB法バンドの特徴
GP160	ENV	糖蛋白質 GP110/120, GP41 の前駆体	幅広いバンド
GP110/120	ENV	膜構成糖蛋白質	幅広いバンド
P68/66	POL	逆転写酵素	明瞭なバンド
P55	GAG	core(核)蛋白質の前駆体	二重バンド
P52/51	POL	逆転写酵素	明瞭なバンド
GP41	ENV	膜貫通糖蛋白質	幅広いバンド
P40	GAG	core(核)蛋白質の前駆体	明瞭なバンド
P34/31	POL	エンドスクレアーゼ	明瞭なバンド
P24/25	GAG	core(核)蛋白質	明瞭なバンド
P18/17	GAG	core(核)蛋白質	二重バンドとなる場合がある

陽性コントロール血清の出現バンドとよく比較しながら次の表に従って解釈してください。

判定	プロファイル
陽性	2本以上のENVバンド
判定保留	陰性、陽性と判定されない
陰性	HIV-1特異バンドが出現しない

本品の判定基準はWHO判定基準に従っています。

2. 判定上の注意

- 1) コントロールバンドが発色していることを、常に確認するようにしてください。コントロールバンドが発色していない、もしくは発色が薄い場合は、検体あるいは試薬の分注が適切に行われなかった可能性があります。
- 2) バンドを確認する場合は、陽性コントロール血清のバンドを参考にしてください。
- 3) HIV-1以外の他のレトロウイルスにより非特異的に所定のバンド以外の位置にバンドが見られることがあります。

- 4) 判定保留、陽性の場合には陽性コントロール血清によるコンタミネーションの可能性も考慮する必要があります。
- 5) HIV-2感染、セロコンバージョン開始前及び他のレトロウイルスにより判定保留になることがあります。
判定保留の場合は少し期間(2週間、4ヵ月、6ヵ月)をあけて再検査及び他の確認検査もあわせて実施し、さらに臨床経過を加味して総合的に判断してください。またHIV-2関連検査も実施するようにしてください。
- 6) 本品で陰性の場合でも完全にHIV感染を否定することはできません。感染初期(感染後6～8週間後)では抗体の出現が見られない場合があります。他法との併用、または3ヵ月後に他法と併用検査を実施してください。
- 7) 本品でHIV-1陽性と判断された場合でも、HIV-2による交差反応を否定することは不可能です。最終的に①HIV-1単独感染、②HIV-2単独感染(HIV-2との交差反応)、③HIV-1+HIV-2重感染の鑑別が必要な場合は、他の方法による試験が必要です。他の方法: イムノブロット法、PCR法、ウイルスの培養等があります。
- 8) 自己免疫疾患患者の血清では、非特異的の反応が起こりうるので測定結果に基づく診断は他の検査結果や臨床症状等を加味して総合的に判断してください。
- 9) 免疫グロブリンを含む血液製剤を投与されている患者血清では、投与された製剤による陽性反応を呈することがあるので、その判定についてはご注意ください。

3. 参考: ウェスタンブロット法及びHIV-1核酸増幅検査(RT-PCR法)の判定結果の組み合わせとその解釈

スクリーニング検査(EIA、PA等)でHIV-1が陽性あるいは判定保留の場合、ウェスタンブロット法及びHIV-1核酸増幅検査(RT-PCR法)を用いて確認試験を行う必要があります。次表は、ウェスタンブロット法及びHIV-1核酸増幅検査法(RT-PCR法)の判定結果の組み合わせとその解釈です。

HIV-1 検査結果		判定・指示事項
ウェスタンブロット法	核酸増幅検査法	
陽性	陽性	HIV-1感染者
	検出せず	HIV-1感染者
保留	陽性	急性HIV-1感染者
	検出せず	HIV-2の確認検査を実施、陰性時は保留とし2週間後に再検査
陰性	陽性	急性HIV-1感染者
	検出せず	HIV-2の確認検査を実施、陰性時は保留とし2週間後に再検査

■ 臨床的意義

HIV抗体の確認試験として用いられる方法の1つにウェスタンブロット法があります。本法は、電気泳動により分画したウイルス構成蛋白をニトロセルロース膜に転写し、検体中の抗体と反応させて検出する方法であり、各種構成蛋白に対する特異抗体の存在を確認することができます。本品は、HIV-1蛋白を用いたウェスタンブロット法の試薬であり、スクリーニング検査で生じた偽陽性などの確認ができるとともに、各蛋白特異抗体の推移を見ることにより、HIV-1感染の経過観察が可能です。

■ 性能

1. 性能

「測定操作法」に記載の操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行った場合、下記の規格に適合します。

- 1) 感度試験
 - ① 陰性コントロール血清を試料として試験した場合、バンドが全て認められない。
 - ② 陽性コントロール血清を試料として試験した場合、全てのバンドが認められる。
- 2) 正確性試験
 - ① 陰性コントロール血清または陰性参照血清を試料として試験した場合、判定結果は陰性を示す。

② 陽性コントロール血清または陽性参照血清を試料として試験した場合、判定結果は陽性を示す。

3) 同時再現性試験

同一陰性検体を3回同時測定するとき、結果は常に陰性である。
同一陽性検体を3回同時測定するとき、結果は常に陽性である。

2. 相関性

ELISA法で陽性が確認された67検体について、本品と対照品(他のウェスタンブロット法)との相関性を検討した結果は、以下のとおりです。

	本品	対照品
陽性	65例	67例
陰性	0例	0例
判定保留	2例	0例
合計	67例	67例

一致率
97.0%(65/67)

判定保留2例はGP160、P24/25のバンドだけが出現していました。
この2例中1例はセロコンバージョンをその後示し、残り1例はRIPA法でGP120だけであることを確認しました。

* ■ 使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 1) 検体はHBV、HCV、HIVなどの感染のおそれがあるものとして取扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングを行わないでください。
- 2) 陰性コントロール血清(R3)はHBs抗原、HIV-1抗体、HIV-2抗体及びHCV抗体の検査を行い、陰性の結果を得ています。陽性コントロール血清(R4)はHBs抗原、HCV抗体陰性及びHIV抗体陽性のヒト血清を不活化処理してから使用しています。しかしながら、ヒト由来成分が含まれておりますので感染性のあるものとして、検体同様十分に注意して取扱ってください。
- 3) 試薬が誤って皮膚に触れたり、目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 1) 試薬は凍結しないように注意してください。保存する場合は、指定の貯蔵方法に従って保存してください。
- 2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 3) 本品は正確な結果が得られるように調製してありますので、ロットの異なる試薬と組み合わせて使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- 1) 検体中にはHBV、HCV、HIVなどが存在する場合がありますので、使用した器具(ピペット、試験管など)及び廃液は、次亜塩素酸ナトリウム液(有効塩素濃度1,000ppm以上、1時間以上浸漬)、グルタルアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)などによる消毒のほか、オートクレーブ処理(121℃、20分)による滅菌や焼却などの処理を行ってください。
- 2) 検体または検体を含む溶液が飛散した場合は下記の方法を参考にして処理してください。
 - ・ アルカリ性溶液が飛散した場合は、飛散した部分を次亜塩素酸ナトリウム液(有効塩素濃度1,000ppm以上)で消毒した後拭き取り、廃棄バッグにいれて決められた指針に従って廃棄してください。
 - ・ 酸性溶液が飛散した場合は、重炭酸ナトリウムなどを用いて中和させた後、同様に次亜塩素酸ナトリウム液を用いて処理してください。
- 3) 陰性コントロール血清(R3)、陽性コントロール血清(R4)及び酵素標識抗体(R5)は、0.1%未満のアジ化ナトリウムを含有しています。アジ化ナトリウムは、鉛管、銅管と反応して爆発性の金属アジドを生成することがありますので、廃棄する場合は、大量の水と共に流してください。
- 4) 試薬及び容器等を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って、医療廃棄物または産業廃棄物等、区別して処理してください。

■ 貯蔵方法・有効期間

1. 貯蔵方法

2~8℃、凍結を避けて保存してください。

2. 有効期間

12ヶ月
(使用期限は外箱ラベルに記載されています)

■ 包装単位

1キット：18枚

■ 主要文献

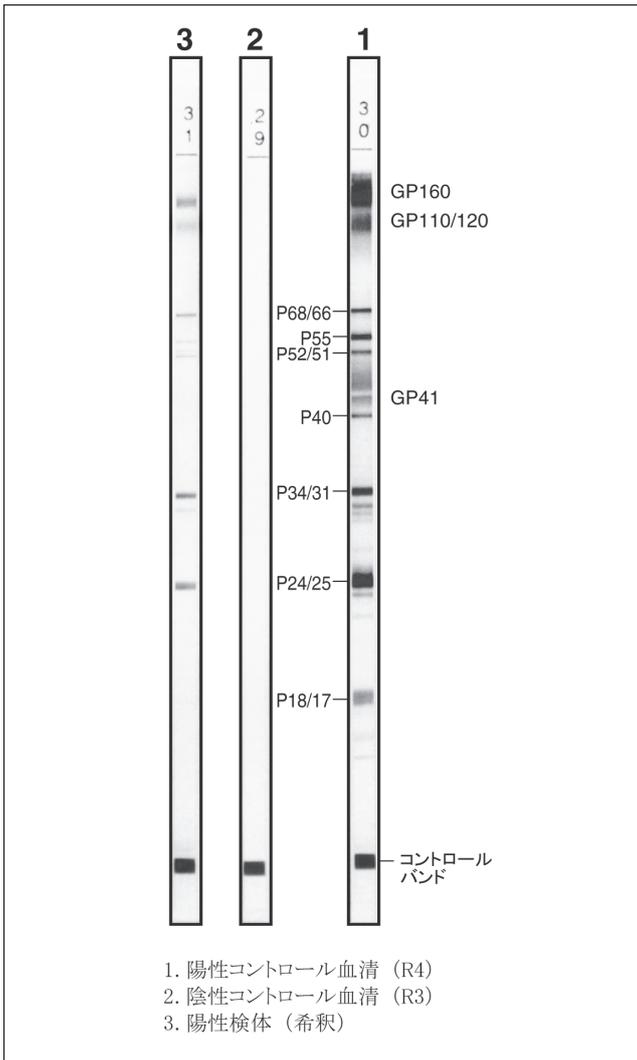
- 1) 原田信志、山本直樹：AIDS関連レトロウイルスの定量とその中和抗体。蛋白質・核酸・酵素、30(13)、1394-1406,1985
- 2) 菱田清、速水正憲、他：HIV-2を含めたHIV抗体検出法の比較検討。医学と薬学、27(4)、959-970,1992
- 3) 吉原なみ子：“血清診断”図説HIV感染症。メジカルビュー社、p88-98.1993
- 4) 吉原なみ子：HIV抗体検査法とRNA定量法。臨床と微生物、25(3)、295-299,1998
- 5) 日本エイズ学会：HIV-1/2感染症の診断法2008(日本エイズ学会・日本臨床検査医学会 標準推奨法)。日本エイズ学会誌、11(1)、70-72,2009

** ■ 問い合わせ先

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
〒140-0002
東京都品川区東品川2-2-24 天王洲セントラルタワー
TEL:0120-925-046
FAX:03-5463-8481

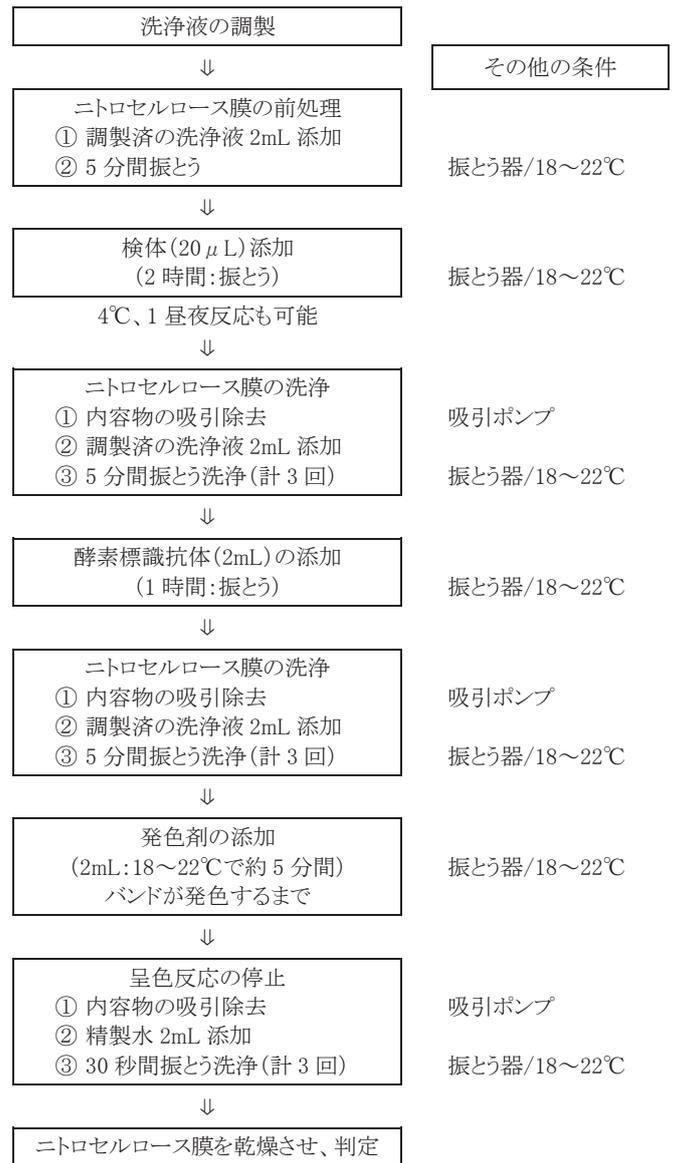
参考写真

*



注意： 実際のバンドの位置は参考写真と多少ずれる場合もあります。最終判定では陽性コントロール血清 (R4) の出現バンドと比較してください。また、コントロールバンドが強く発色している事を毎回確認するようにしてください。

ラブ プロット 1: 操作法



製造販売元



パイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
東京都品川区東品川 2-2-24 天王洲セントラルタワー
TEL: 03-6361-7070