

ВЕКТОР



Набор реагентов
для подтверждения
наличия антител
к вирусу гепатита С (ВГС)
методом иммунного блоттинга

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ВГС-блот – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0712

«ВГС-блот – БЕСТ» представляет собой набор реагентов для подтверждения методом иммуноблоттинга наличия антител к ВГС у лиц, сыворотка (*плазма*) крови которых даёт положительную реакцию в ИФА. Набор может быть использован в клинических, эпидемиологических и лабораторных исследованиях.

Основным компонентом набора являются полоски нитроцеллюлозной мембраны (*стрипы*) с сорбированными на них рекомбинантными антигенами ВГС, соответствующими участкам белков, кодируемых структурной (*core1, core2*) и неструктурной (*NS3, NS4, NS5*) областями генома вируса. Каждый антиген сорбирован на мембране в виде индивидуальной полосы. В качестве контрольных полос на стрипе сорбированы моноклональные антитела к IgG человека (*MoAT-A*).

Стрипы инкубируют с исследуемыми образцами сывороток (*плазмы*) и с контрольными сыворотками, входящими в состав набора. Если в образцах присутствуют специфические антитела к ВГС, происходит их связывание с вирусными белками, сорбированными на стрипе. Затем стрипы инкубируют с конъюгатом (*моноклональные антитела против IgG человека, меченные пероксидазой*), который связывается с иммунными комплексами, присутствующими

на стрипе. Визуализацию специфических комплексов АГ-АТ проводят, добавляя хромогенный субстрат. В результате на стрипах образуются окрашенные полосы, соответствующие сорбированным белкам.

Один набор рассчитан на анализ 20 образцов, включая контроли. Возможны 4 независимые постановки.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«ВГС-блот – БЕСТ» предназначен для подтверждения наличия антител к ВГС в сыворотке и плазме крови человека.

2. СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – полоски нитроцеллюлозной мембраны (*стрипы*) с сорбированными на них рекомбинантными антигенами ВГС – 20 шт.;
- контрольный положительный образец, инактивированный (K^+) – 1 фл., 0,3 мл;
- контрольный отрицательный образец, инактивированный (K^-) – 1 фл., 0,3 мл;
- конъюгат (*моноклональные антитела к иммуноглобулинам класса G человека, меченные пероксидазой хрена*) – 4 фл.;
- раствор для разведения сывороток и конъюгата (РРСК) – 2 фл. по 50 мл;
- раствор хромогена (*4 хлор-1-нафтол*) – 1 фл., 8 мл;
- концентрат трис-солевого буферного раствора с твином (ТСБ-Т×10) – 2 фл. по 50 мл;
- субстратный раствор (СР) – 1 фл., 50 мл;
- кювета с 6-ю ячейками – 4 шт.;
- пинцет – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- * работать в резиновых перчатках;
- * не пипетировать растворы ртом;
- * все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (*не менее 6 часов*).

Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов иммуноблота.

- Для приготовления растворов и проведения анализа следует использовать чистую посуду и **одноразовые наконечники** к автоматическим пипеткам с погрешностью измерения объёмов не более 5%.
- Для анализа рекомендуется брать свежеприготовленные образцы сыворотки и плазмы. Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С не более 1 мес.
- Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует отцентрифугировать 10-15 мин при 3000 об./мин.

- Нельзя использовать проросшие, гемолизованные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.
- Перед проведением анализа все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при (18-25)°С.
- Концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен за 15-20 мин до использования.
- Рабочие растворы субстрата и конъюгата готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие прямого света на раствор субстрата.
- Необходимо строго соблюдать режим промывания, следя за тем, чтобы отмывающий раствор заполнял все ячейки кюветы, а затем был полностью удалён.
- Не допускать высыхания стрипов между отдельными операциями анализа.
- Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов.
- Нельзя использовать набор по истечении срока годности.
- Для приготовления растворов использовать только дистиллированную или деионизованную воду.

- Запрещается повторно использовать кюветы для постановки анализов.
- Стрипы следует брать только пинцетом.
- Не следует разрезать стрипы, т.к. это приводит к искажению результатов.
- Во время инкубации стрипов с сыворотками и конъюгатом кювету следует прикрывать крышкой во избежание высыхания стрипов. При этом (*особенно после ночной инкубации*) на крышке может образоваться конденсат, поэтому крышку следует убирать очень осторожно, чтобы не произошло смешивание исследуемых образцов и последующего искажения результата анализа.
- Во время инкубации стрипов с субстратом кювету следует закрывать крышкой так, чтобы в неё не проникал свет.

3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Внимание! Перед приготовлением все реагенты выдерживают при (18-25)°С не менее 30 мин и осторожно перемешивают содержимое флаконов, избегая пенообразования.

3.1.1. Отмывающий раствор (ОР)

В зависимости от количества используемых стрипов готовить ОР (см. табл. 1).

Таблица 1

Количество стрипов (шт.)	Объём ТСБ-Т×10 (мл)	Объём воды дистиллированной или деионизованной (мл)
3-5	10	90
6-10	20	180
11-15	30	270
16-20	40	360

Хранение: при (2-8)°С 1 месяц.

3.1.2. Концентрированный раствор конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наколечники для пипеток.

Для приготовления концентрированного раствора конъюгата во флакон с конъюгатом добавить 1 мл РРСК.

Хранение: при (2-8)°С 1 месяц.

3.1.3. Рабочий раствор хромогена

Внимание! Рабочий раствор хромогена готовить непосредственно перед использованием, т. к. раствор быстро разлагается на свету (см. табл. 2).

Таблица 2

Количество стрипов (шт.)	Объём раствора хромогена (мл)	Объём субстратного раствора (мл)
3	1	5
4-6	2	10
7-9	3	15
10-12	4	20
13-15	5	25
16-20	7	35

Хранение: **рабочий раствор хромогена хранению не подлежит.**

3.2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание!

1) *Перед проведением анализа все компоненты тест-системы выдерживают при (18-25)°C не менее 30 мин.*

2) *Положительные и отрицательные контроли должны ставиться с каждой серией образцов, независимо от их количества.*

3.2.1. Приготовить отмывающий раствор (ОР) (п. 3.1.1).

3.2.2. Во все ячейки кюветы внести по **2 мл ОР**.

3.2.3. Пинцетом осторожно достать стрипы из пробирки и поместить в ячейки кюветы промаркированной стороной вверх.

3.2.4. Кювету со стрипами поместить на качающуюся платформу и инкубировать 15 мин, затем раствор удалить.

3.2.5. В ячейки кюветы внести по **2 мл РРСК** и по **40 мкл контрольных или исследуемых образцов**. Кювету закрыть крышкой, поместить на качающуюся платформу и инкубировать в течение ночи, (16±2) часа.

3.2.6. Осторожно снять крышку и удалить раствор из кюветы.

3.2.7. Во все ячейки кюветы внести по **2 мл ОР** и сразу удалить его. После этого стрипы промыть ОР в течение 5 мин на качающейся платформе. Повторить эту операцию трижды.

3.2.8. В ячейки кюветы внести по **2 мл РРСК** и по **▲▲▲ мкл концентрированного раствора конъюгата** (п. 3.1.2). Кювету закрыть и инкубировать 1 час на качающейся платформе.

3.2.9. Осторожно снять крышку и удалить раствор из кюветы.

3.2.10. Стрипы промыть, как описано в п. 3.2.7.

3.2.11. Приготовить рабочий раствор хромогена (п. 3.1.3).

3.2.12. Во все ячейки кюветы внести по **2 мл рабочего раствора хромогена**. Кювету закрыть, чтобы в неё не проникал свет, поместить на качающуюся платформу и инкубировать 30 мин.

3.2.13. Из ячеек кюветы удалить раствор хромогена. Стрипы промыть дистиллированной водой 5 раз, чтобы остановить ферментативную реакцию.

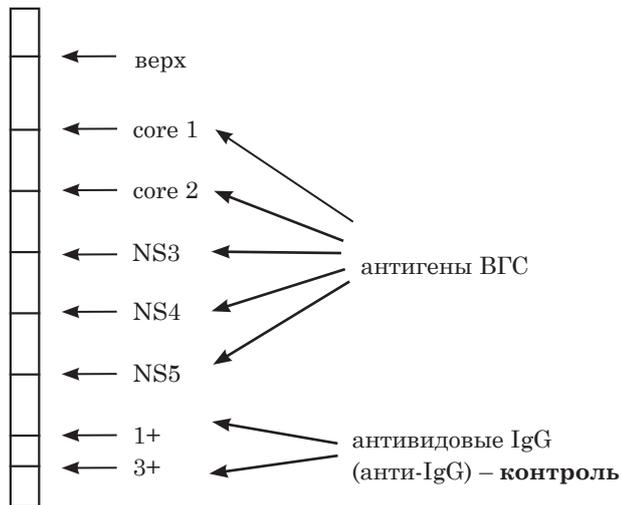
3.2.14. Пинцетом осторожно достать стрипы из кюветы, положить на фильтровальную бума-

гу, сверху тоже накрыть бумагой и высушить в темноте при комнатной температуре 20-30 мин. Чтобы избежать обесцвечивания стрипов, их следует хранить в защищённом от света месте при комнатной температуре.

4. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов проводят после полного высыхания стрипов.

Схема расположения антигенных и контрольных полос на стрипе показана на рисунке.



Учёт результатов проводят только в том случае, если:

- на стрипе, который инкубировали с отрицательным контрольным образцом, присутствуют только анти-IgG контрольные полосы (*одна или две*);
- на стрипе, который инкубировали с положительным контрольным образцом, присутствуют все полосы, представленные на рисунке.

Интенсивность каждой полосы антигена на всех стрипах определяется сравнением с контрольными полосами (*1+ анти-IgG и 3+ анти-IgG*) стрипа, который инкубировали с положительным контрольным образцом (*см. табл. 3*).

Оценка интенсивности окрашивания полосы

Таблица 3

Интенсивность окрашивания полосы	Оценка
Окраска отсутствует	–
Окраска слабее, чем 1+ на стрипе K ⁺	+/-
Окраска соответствует 1+ на стрипе K ⁺	1+
Окраска сильнее, чем 1+, но слабее, чем 3+ на стрипе K ⁺	2+
Окраска соответствует 3+ на стрипе K ⁺	3+
Окраска сильнее, чем 3+ на стрипе K ⁺	4+

4.1. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 1) сыворотка расценивается **как отрицательная** (*не содержащая антител к ВГС*), если на стрипе присутствуют только контрольные полосы (*одна или две*);
- 2) сыворотка расценивается **как положительная** (*содержащая антитела к ВГС*), если на стрипе присутствуют две или более антигенные полосы интенсивностью не ниже 1+;
- 3) сыворотка расценивается **как неопределённая**, если на стрипе присутствует сочетание антигенных полос, не подходящее под критерий положительности; в этом случае рекомендуется повторное тестирование. Если неопределённый результат повторяется, следует провести тестирование через несколько месяцев.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

Хранить набор «ВГС-блот – БЕСТ» или отдельные его компоненты следует при (2-8)°С. Замораживание не допускается!

Допускается транспортирование наборов всеми видами крытого транспорта при температуре до 25°С не более 3 суток.

Рекламации на качество набора направлять

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, п. Кольцово Новосибирской обл.,
Новосибирского района, а/я 121,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30, 227-67-64,
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

29.09.09

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путём
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@online.nsk.su

Internet: www.vector-best.ru