

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для підтвердження наявності антитіл до вірусу гепатиту С (ВГС)
методом імуного блотингу
«ВГС-блот-БЕСТ»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

«ВГС-блот-БЕСТ» являє собою набір реагентів для підтвердження методом імуного блотингу наявності антитіл до ВГС у осіб, сироватка (плазма) крові яких дає позитивну реакцію в ІФА. Набір може бути використаний в клінічних, епідеміологічних і лабораторних дослідженнях.

Основним компонентом набору є смужки нітроцелюлози мембрани (стрипи) з сорбованих на них рекомбінантними антигенами ВГС, відповідними ділянок білків, кодованих структурної (core1, core2) і неструктурної (NS3, NS4, NS5) областями геному вірусу. Кожен антиген сорбувати на мембрані у вигляді індивідуальної смуги. В якості контрольних смуг на стрипі сорбовані моноклональні антитіла до IgG людини (МоАТ-А).

Один набір розрахований на аналіз 20 зразків, включаючи контролю. Можливі 4 незалежні постановки.

«ВГС-блот-БЕСТ» призначений для підтвердження наявності антитіл до ВГС у сироватці та плазмі крові людини.

2. СКЛАД НАБОРУ

імуносорбент - смужки нітроцелюлози мембрани (стрипи) з сорбованих на них рекомбінантними антигенами ВГС - 20 шт.
контрольний позитивний зразок, інактивований (К+) - 1 фл., 0,3 мл;
контрольний негативний зразок, інактивований (К-) - 1 фл., 0,3 мл;
кон'югат (моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу G людини, мічені пероксидазою хрому) - 4 фл.;
розчин для розведення сироваток та кон'югату (РРСК) - 2 фл. по 50 мл;
розчин хромогену (4 хлор-1-нафтол) - 1 фл., 8 мл;
концентрат трис-сольового буферного розчину з твін (ТСБ-Т × 10) - 2 фл. по 50 мл;
субстратний розчин (СР) - 1 фл., 50 мл;
кювета з 6-ма осередками - 4 шт.
пінцет - 1 шт.
Інструкції щодо використання - 1 шт.

3. СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

При роботі з досліджуваними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватися запобіжних заходів, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом:

працювати в гумових рукавичках;
не піпетувати розчини ротом;
всі використані матеріали піддавати обробці 6%-ним розчином перекису водню (не менше 6 годин).

УВАГА! Ретельне дотримання описаних нижче вимог дозволить уникнути спотворення результатів імуноблоту.

- Для приготування розчинів та проведення аналізу слід використовувати чистий посуд і одноразові наконечники до автоматичних піпеток з похибкою вимірювання обсягів не більше 5%.

- Для аналізу рекомендується брати свіжоприготовані зразки сироватки і плазми. Допускається використання зразків, що зберігалися при (2-8) ° С не більше 5 діб, або при мінус (20 ± 3) ° С не більше 1 міс.

- Сироватки, що містять зважені частки, можуть дати неправильний результат. Такі зразки перед використанням слід отцентрифугувати 10-15 хв при 3000 об. / хв.

- Не можна використовувати пророслі, гемолізовані, гіперліпідні сироватки або піддавалися багаторазового заморожування і відтавання.

- Перед проведенням аналізу всі компоненти набору необхідно витримати не менше 30 хв при (18-25) ° С.

- Концентрований розчин кон'югату повинен бути приготований за 15-20 хв до використання.

- Робочі розчини субстрату та кон'югату готувати безпосередньо перед використанням. Виключити вплив прямого світла на розчин субстрату.

- Необхідно суворо дотримуватися режиму промивання, стежачи за тим, щоб відмивати розчин заповнював всі комірки кювети, а потім був повністю знищений.

- Не допускати висихання стрипів між окремими операціями аналізу.
- Не можна використовувати компоненти з наборів різних серій або змішувати їх при приготуванні розчинів.
- Не можна використовувати набір після закінчення терміну придатності.
- Для приготування розчинів використовувати тільки дистильовану або деіонізовану воду.
- Забороняється повторно використовувати кювети для постановки аналізів.
- Стрипи слід брати тільки пінцетом.
- Не слід розрізати стрипи, т.к. це призводить до спотворення результатів.
- Під час інкубації стрипів з сироватками і кон'югатом кювету слід прикривати кришкою, щоб уникнути висихання стрипів. При цьому (особливо після нічної інкубації) на кришці може утворитися конденсат, тому кришку слід прибирати дуже обережно, щоб не відбулося змішування досліджуваних зразків і подальшого спотворення результату аналізу.
- Під час інкубації стрипів з субстратом кювету слід закривати кришкою так, щоб у неї не проникало світло.

3.1. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Увага! Перед приготуванням всі реагенти витримують при (18-25) ° С не менше 30 хв і обережно перемішують вміст флаконів, уникаючи піноутворення.

3.1.1. ВІДМИВАЮЧИЙ РОЗЧИН (ВР)

Залежно від кількості використовуваних стрипів готувати ВР (див. табл. 1).

Таблиця 1

Кількість стрипів (шт.)	Об'єм ТСБ-Т×10 (мл)	Об'єм дистильованої води (мл)
3-5	10	90
6-10	20	180
11-15	30	270
16-20	40	360

Зберігання: при (2-8) ° С 1 місяць.

3.1.2. КОНЦЕНТРОВАННИЙ РОЗЧИН КОН'ЮГАТУ

Увага! Для роботи з кон'югатом рекомендуємо використовувати одноразові наконечники для піпеток.

Для приготування концентрованного розчину кон'югату у флакон з кон'югатом додати 1 мл РРСК.

Зберігання: при (2-8) ° С 1 місяць.

3.1.3. РОБОЧИЙ РОЗЧИН ХРОМОГЕНУ

Увага! Робочий розчин хромогену готувати безпосередньо перед використанням, т. к. розчин швидко розкладається на світлі (див. табл. 2).

Таблиця 2

Кількість стрипів (Шт.)	Обсяг розчину хромогену (мл)	Обсяг субстратного розчину (Мл)
3	1	5
4-6	2	10
7-9	3	15
10-12	4	20
13-15	5	25
16-20	7	35

Зберігання: робочий розчин хромогену зберігання не підлягає.

3.2. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

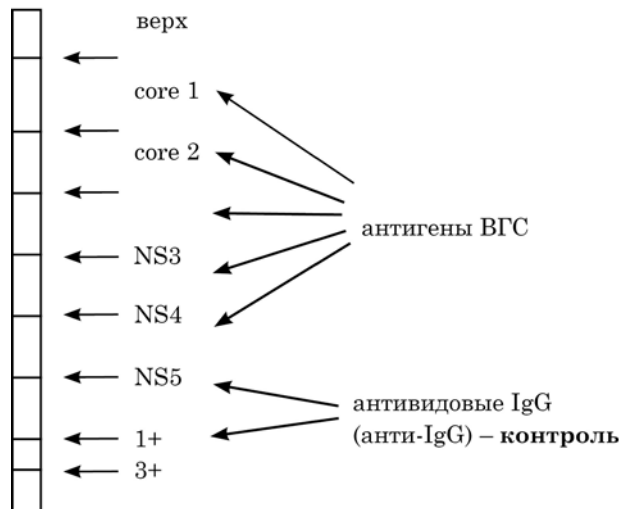
УВАГА!

- 1) Перед проведенням аналізу всі компоненти тест-системи витримують при (18-25) ° С не менше 30 хв.
 - 2) Позитивні і негативні контролю повинні ставитися з кожною серією зразків, незалежно від їх кількості.
- 3.2.1. Приготувати відмивають розчин (ВР) (п. 3.1.1).
 - 3.2.2. У всі клітинки кювети внести по 2 мл ВР.
 - 3.2.3. Пінцетом обережно дістати стрипи з пробірки і помістити в комірки кювети промаркованої стороною вгору.
 - 3.2.4. Кювету зі стрипах помістити на хитку платформу і інкубувати 15 хв, потім розчин видалити.
 - 3.2.5. У комірки кювети внести по 2 мл РРСК і по 40 мкл контрольних або досліджуваних зразків. Кювету закрити кришкою, помістити на хитку платформу і інкубувати протягом ночі, (16 ± 2) години.
 - 3.2.6. Обережно зняти кришку і видалити розчин з кювети.
 - 3.2.7. У всі клітинки кювети внести по 2 мл ВР і відразу видалити його. Після цього стрипи промити ВР протягом 5 хв на хиткій платформі. Повторити цю операцію тричі.
 - 3.2.8. У комірки кювети внести по 2 мл РРСК і по 40 мкл концентрованого розчину кон'югату (п. 3.1.2). Кювету закрити і інкубувати 1 година на качающійся платформі.
 - 3.2.9. Обережно зняти кришку і видалити розчин з кювети.
 - 3.2.10. Стрипи промити, як описано в п. 3.2.7.
 - 3.2.11. Приготувати робочий розчин хромогену (п. 3.1.3).
 - 3.2.12. У всі клітинки кювети внести по 2 мл робочого розчину хромогену. Кювету закрити, щоб у неї не проникало світло, помістити на хитку платформу і інкубувати 30 хв.
 - 3.2.13. З осередків кювети видалити розчин хромогену. Стрипи промити дистильованою водою 5 разів, щоб зупинити ферментативну реакцію.
 - 3.2.14. Пінцетом обережно дістати стрипи з кювети, покласти на фільтрувальний папір, зверху теж накрити папером і висушити в темряві при кімнатній температурі 20-30 хв. Щоб уникнути знебарвлення стрипів, їх слід зберігати в захищеному від світла місці при кімнатній температурі.

4. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

Облік результатів проводять після повного висихання стрипів.

Схема розташування антигенних і контрольних смуг на стрипі показана на малюнку.



Облік результатів проводять тільки в тому випадку, якщо:

- на стрипі, який інкубували з негативним контрольним зразком, присутні тільки анти-IgG контрольні смуги (одна або дві);
- на стрипі, який інкубували з позитивним контрольним зразком, присутні всі смуги, представлені на малюнку.

Інтенсивність кожної смуги антигену на всіх стрипах визначається порівнянням з контрольними смугами (1 + анти-IgG і 3 + анти-IgG) стрипу, який інкубували з позитивним контрольним зразком (див. табл. 3).

Інтенсивність забарвлення смуги	Оцінка
Забарвлення відсутня	–
Забарвлення слабкіше, ніж 1 + на стрипі К +	+/-
Забарвлення відповідає 1 + на стрипі К +	1+
Забарвлення сильніше, ніж 1 +, але слабкіше, ніж 3 + на стрипі К +	2+
Забарвлення відповідає 3 + на стрипі К +	3+
Забарвлення сильніше, ніж 3 + на стрипі К +	4+

4.1. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. сироватка розцінюється як негативна (не містить антитіл до ВГС), якщо на стрипі присутні тільки контрольні смуги (одна або дві);
2. сироватка розцінюється як позитивна (містить антитіла до ВГС), якщо на стрипі присутні дві або більше антигенні смуги інтенсивністю не нижче 1 +;
3. сироватка розцінюється як невизначена, якщо на стрипі присутній поєднання антигенних смуг, не підходить під критерій позитивності; в цьому випадку рекомендується повторне тестування. Якщо невизначений результат повторюється, слід провести тестування через кілька місяців.

5. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Термін придатності набору - 14 місяців з дня випуску.

Зберігати набір «ВГС-блот-БЕСТ» або окремі його компоненти слід при (2-8) ° С. Заморожування не допускається! Допускається транспортування наборів всіма видами критого транспорту при температурі до 25 ° С не більше 4 діб. Заморожування набору не допускається.

З питань, що стосуються якості набору, звертається в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9,

тел./факс: (044) 500-57-11

e-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.