

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г. № _____

« ____ » _____ 2007 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для подтверждения наличия антител к вирусу
гепатита С методом иммунного блоттинга
(ВГС-блот-Бест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВГС-блот-Бест» (далее по тексту – набор) предназначен для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С методом иммунного блоттинга в сыворотке (плазме) крови человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 12 исследований, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод применения основан на иммунном блоттинге с применением рекомбинантных антигенов. 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 рекомбинантными антигенами ВГС, 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 антиген-антитело проводят, добавляя хромогенный субстрат. В результате на стрипах образуются полосы, соответствующие сорбированным белкам.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

— иммуносорбент — полоски нитроцеллюлозной мембраны (стрипы) с иммобилизованными на них в виде отдельных полос рекомбинантными антигенами ВГС

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по произ-

водству В.В. Титовым и начальником отделения Н.Ю. Федосовой

и иммобилизованными в виде двух контрольных полос моноклональными антителами к IgG человека – 12 шт., упакованные в пластиковую пробирку – 1 проб.;

- положительный контрольный образец (K^+), инактивированный, лиофилизированный – 1 фл.;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный, лиофилизированный – 1 фл.;
- конъюгат, лиофилизированный – 1 фл.;
- 4-хлор-1-нафтол (ХН) – сухой – 1 фл., 12,0 мг;
- 10-кратный концентрат трис-солевого буферного раствора с твином (ТСБ-Т×10) – 2 фл. по 20,0 мл;
- 10-кратный концентрат трис-солевого буферного раствора (ТСБ×10) – 1 фл., 10,0 мл;
- этиловый спирт, 96 % – 1 фл., 4,0 мл;
- перекись водорода, 30 % – 1 фл., 0,2 мл;
- сухое молоко (СМ) – 1 фл., 250,0 мг.

Дополнительно в комплект поставки набора входят:

- кюветы для иммунного блоттинга – 2 шт.;
- пинцет – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность.

Набор должен реагировать с положительными сыворотками отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-310-02П, содержащими антитела к вирусу гепатита С, и с положительным контрольным образцом (K^+), и не должен реагировать с отрицательными сыворотками отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-310-02П, не содержащими антитела к ВГС, и с отрицательным контрольным образцом (K^-).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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% раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- платформа качающаяся, интенсивность перемешивания 2-50 об/мин;
- холодильник бытовой;

- таймер;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88);
- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл (ГОСТ 1770-74Е);
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл (ГОСТ 1770-74Е);
- вода очищенная (ФС 42-2619-97);
- 6% раствор перекиси водорода (ГОСТ 177-88Е).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы крови у обследуемых лиц в количестве не менее 0,5 мл отбирают из вены или из пальца натошак.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Поэтому перед постановкой их следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2-8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ не более 1 месяца. Нельзя использовать сыворотки с признаками микробной контаминации, гемолизированные, гиперлипидные, подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

Перед постановкой анализа исследуемые образцы прогревают не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед использованием все компоненты набора (кроме этилового спирта) необходимо выдержать не менее 30 мин при (18–25) °С.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Приготовление отмывающего раствора (ОР).

Взболтать содержимое каждого флакона ТСБ-Т×10. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка. Содержимое флакона доводят дистиллированной водой до 200 мл, перемешивают. Приготовленный промывочный раствор можно хранить до 24 ч при (18-25) °С

7.2.2. Приготовление трис-солевого буферного раствора (ТСБ).

Взболтать содержимое каждого флакона ТСБ×10. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка. Содержимое флакона доводят дистиллированной водой до 100 мл, перемешивают. Приготовленный трис-солевой буферный раствор можно хранить до 24 ч при (18-25) °С.

7.2.3. Приготовление раствора для разведения сывороток и конъюгата (РРСК)

Содержимое флакона с сухим молоком (СМ) растворить в 50 мл ОР, осторожно взбалтывать. Приготовленный раствор для разведения сывороток и конъюгата можно хранить до 24 ч при (18-25) °С.

7.2.4. Подготовка контрольных образцов.

Во флаконы с лиофилизированными положительным контрольным образцом (K^+) и отрицательным контрольным образцом (K^-) добавить по 2,0 мл РРСК, осторожно перемешать. Приготовленные контрольные образцы можно хранить до 1 ч при (18-25) °С.

7.2.5. Приготовление растворов конъюгата

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путем растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РРСК.

Концентрированный раствор конъюгата можно хранить до 24 ч при (2-8) °С или до 1 ч при (18-25) °С.

Внимание! *Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием, так как он хранению не подлежит!*

Отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата (указывается для каждой серии тест-системы) смешать с 24 мл РРСК.

7.2.6. Приготовление хромогенного субстрата (ХС)

Внимание! *Раствор хромогенного субстрата готовят непосредственно перед использованием, так как он хранению не подлежит!*

Содержимое флакона с сухим 4-хлор-1-нафтолом (ХН) растворить в 4,0 мл охлажденного до 4 °С этилового спирта. К полученному спиртовому раствору ХС добавить 20 мл ТСБ и 25 мкл перекиси водорода 30 %.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. В каждую ячейку кюветы для иммунного блоттинга внести по 2,0 мл ОР (п. 7.2.1)

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

7.3.3. Кювету со стрипами поместить на качающуюся платформу и инкубировать 15 мин при (18-25) °С, затем раствор удалить.

7.3.4. В первые две ячейки кюветы внести по 2,0 мл K^+ и K^- , приготовленных по п.7.2.4. В остальные ячейки внести по 2,0 мл РРСК (п. 7.2.3.) и по 40 мкл исследуемых образцов. Кювету закрыть крышкой, поместить на качающуюся платформу и инкубировать в течение 12-18 ч при (18-25) °С.

7.3.5. Осторожно снять крышку и удалить раствор из кюветы.

7.3.6. В каждую ячейку кюветы внести по 2,0 мл ОР и сразу удалить его. После этого стрипы трижды промыть в 2,0 мл ОР по 5 мин на качающейся платформе при (18-25) °С.

7.3.7. В каждую ячейку кюветы внести по 2,0 мл рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п. 7.2.5 Кювету закрыть и инкубировать 1 ч на качающейся платформе при (18-25) °С.

7.3.8. Осторожно снять крышку и удалить раствор из кюветы.

7.3.9. Стрипы промыть, как описано в п. 7.3.6.

7.3.10. В каждую ячейку кюветы внести по 2,0 мл ТСБ (п. 7.2.2) и стрипы отмывать в течение 5 мин на качающейся платформе при (18-25) °С. Эту операцию повторяют дважды.

7.3.11. В каждую ячейку кюветы внести по 2,0 мл ХС, приготовленного по п. 7.2.6 Кювету закрыть, чтобы в неё не проникал свет, поместить на качающуюся платформу и инкубировать 30 мин при (18-25) °С.

7.3.12. Из ячеек кюветы удалить индикатор пероксидазы. Стрипы промыть 5 раз дистиллированной водой, чтобы остановить ферментативную реакцию.

7.3.13. Пинцетом осторожно достать стрипы из кюветы, выложить на фильтровальную бумагу, сверху также накрыть бумагой и высушить на воздухе. Стрипы хранить в защищённом от света месте при (18-25) °С.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрацию результатов провести визуально не менее, чем через 15 мин после полного высыхания стрипов.

Схема расположения полос антигенов ВГС и контрольных полос (антивидовых IgG) на стрипе показана на рис. 1:

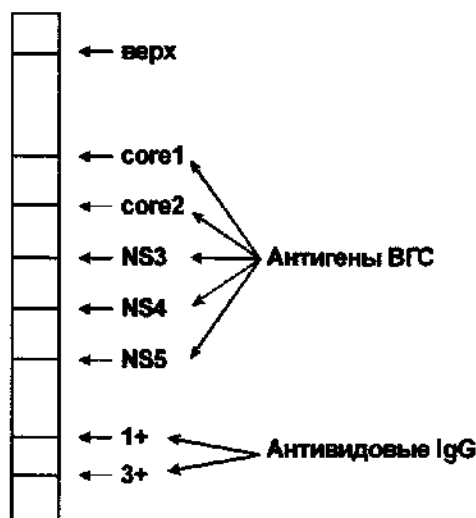


Рис. 1.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов проводят только в том случае, если:

- на стрипе, который инкубировали с отрицательным контрольным образцом, присутствуют только контрольные полосы анти-IgG (одна или две);
- на стрипе, который инкубировали с положительным контрольным образцом, присутствуют все полосы, представленные на рис. 1.

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

Таблица 1

Оценка интенсивности окрашивания полосы

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКРАШИВАНИЯ ПОЛОСЫ	ОЦЕНКА
Окраска отсутствует	–
Окраска слабее, чем 1+ на стрипе К ⁺	+/-
Окраска соответствует 1+ на стрипе К ⁺	1+
Окраска сильнее, чем 1+, но слабее, чем 3+ на стрипе К ⁺	2+
Окраска соответствует 3+ на стрипе К ⁺	3+
Окраска сильнее, чем 3+ на стрипе К ⁺	4+

Интерпретация результатов:

1) сыворотку расценивать, как отрицательную (не содержащую антител к ВГС), если на стрипе окрашены только контрольные полосы (одна или две);

2) сыворотку расценивать, как положительную (содержащую антитела к ВГС), если на стрипе, кроме контрольных, присутствуют две или более полосы антигенов ВГС с интенсивностью окраски не ниже 1+;

3) сыворотку расценивать, как неопределённую, если на стрипе присутствует сочетание окрашенных полос антигенов ВГС, не подходящее под критерий положительности; в этом случае рекомендуется провести повторное тестирование и, если неопределённый результат повторяется, следует провести тестирование через несколько месяцев.

10. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Набор ВГС-блот-Бест хранить и транспортировать при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

10.2. Срок годности набора – 6 месяцев.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

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

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

и в **Федеральное государственное учреждение науки «Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора** по адресу:

119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22.

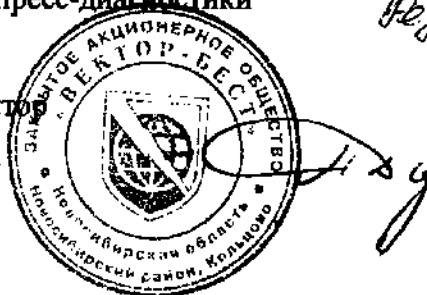
Нач. отделения экспресс-диагностики

Федосова

Н.Ю. Федосова

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов