

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для выявления антител к отдельным антигенам вируса гепатита С методом иммунного блоттинга с применением рекомбинантных вирусоспецифических полипептидов

"Блот-ВГС "

ТУ 9398-015-10839330-2012

**Е-0211 БЛОТ-ВГС**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов "Блот-ВГС", далее по тексту - Набор, предназначен для подтверждения выявления антител к отдельным антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке или плазме крови человека методом линейного иммуноанализа (иммунного блоттинга).

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности **иммуносорбента** - полосок нитроцеллюлозных мембран в виде поперечных линий иммобилизованы очищенные рекомбинантные полипептиды - аналоги антигенов ВГС и контрольные антигены специфичности и правильности проведения реакции:

рекомбинантные антигены «Core 1», «Core 2», «NS3», «NS4» и «NS5» (линии №№ 1-5 на рис.1) представляют собой синтезированные в *E.coli* полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность протективного белка ( $\beta$ -галактозидазы *E.coli*) и аминокислотные последовательности антигенных детерминант нуклеокапсидного и неструктурных белков NS3, NS4 и NS5 ВГС соответственно;

контрольный антиген специфичности реакции ( $K_{Ag}$ ) (линия № 5 на рис.1) представляет собой синтезированный в *E.coli* рекомбинантный полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и не содержащий антигенных детерминант ВГС;

контрольный антиген правильности проведения реакции ( $K_p$ ) (линия № 6 на рис.1) представляет собой сыворотку против IgG человека.

**Положительный контрольный образец инактивированный  $K^+$**  представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к ВГС и не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигена р24 ВИЧ и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

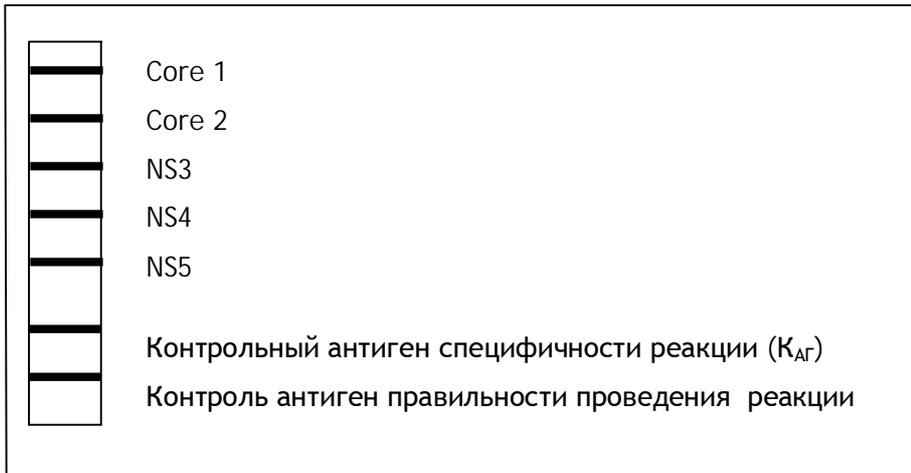
**Отрицательный контрольный образец инактивированный  $K^-$**  представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител к ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигена р24 ВИЧ и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

**Конъюгат** представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена.

**Раствор № 4 для разведения хромогена** содержит субстрат ферментативной реакции.

**Хромогеном** является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

**Рис 1.** Размещение иммобилизованных вирусоспецифических и контрольных антигенов на полоске мембраны.



Анализируемые образцы инкубируют с иммуносорбентом в канавках **планшетов для проведения реакции**. Содержащиеся в образцах иммуноглобулины к вирусу гепатита С специфически взаимодействуют с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Контрольный антиген правильности проведения реакции связывается с иммуноглобулинами класса G, 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 в исследуемом образце. После удаления несвязавшихся антител в канавки планшетов с мембранами добавляют конъюгат, который взаимодействует с комплексами антиген-антитело, образовавшимися на предыдущем этапе реакции. После отмывки несвязавшихся молекул конъюгата, мембраны выдерживают с индикаторным раствором, включающем субстрат и хромоген. 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. После остановки реакции результаты учитывают визуально по окрашиванию **линий на полосках**.

## 2.2. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в виде набора компонентов, упакованных в коробку:

Наименование компонента набора	Количество	Описание
Иммуносорбент	24 мембраны 1 пробирка	Полоски нитроцеллюлозной мембраны белого цвета размером 40×4 мм, маркированные по верхнему краю цифрами, с выпуклыми поперечными линиями, на которых иммобилизованы антигены.
Положительный контрольный образец инактивированный K <sup>+</sup>	0,25 мл 1 пробирка	Прозрачная или слегка опалесцирующая, жидкость розового цвета.
Отрицательный контрольный образец инактивированный K <sup>-</sup>	0,25 мл 1 пробирка	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.
Конъюгат	25 мл 1 флакон	Прозрачная светло-желтого цвета жидкость.
Концентрат раствора № 2 блокирующего	31 мл 1 флакон	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость; допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка, легко разбивающегося при встряхивании.
Раствор № 3 для разведения сывороток	25 мл 1 флакон	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость, допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка, легко разбивающегося при встряхивании.
Раствор № 4 для разведения хромогена	30 мл 1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Хромоген	1,0 мл 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор № 6 для остановки реакции	25 мл 1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Планшет для проведения реакции	2 или 3 шт.	Пластмассовый планшет с 12- или 8-канавками соответственно

Набор рассчитан на проведение 24 анализов, включая контрольные.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 3.1. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ.

Чувствительность на «Стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С» (ОСО 42-28-310-02П), составляет 100%.

### 3.2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ.

Специфичность на «Стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С» (ОСО 42-28-310-02П), составляет 100%.

#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

Для проведения анализа необходимо использовать:

- орбитальное качающее устройство или качающее устройство типа КУ-400;
- аспиратор вакуумный типа ОХВЗ-01-«Дубна»;
- дистиллятор типа АДЭ-25;
- пинцет пластмассовый;
- пипетки автоматические одноканальные («Gilson», Франция, Р200, Р1000, Р5000) со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- цилиндры мерные вместимостью 10 мл и 200 мл;
- стаканы мерные вместимостью 10 мл и 200 мл;
- перчатки резиновые хирургические;
- спирт этиловый;
- перекись водорода;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- одноразовая посуда для приготовления рабочих растворов конъюгата и хромогена;
- липкая пленка для заклейки планшетов.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме 20 мкл.

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.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием. Собранные образцы сыворотки или плазмы хранят при температуре от 4 °С до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше минус 15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

### **ВНИМАНИЕ!**

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Анализ проб следует проводить так, чтобы на одного оператора одновременно приходилось не более одного набора.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ (для проведения 8 анализов)

Перед началом работы используемые компоненты набора выдержать при комнатной температуре 30 мин. Неиспользованные компоненты после вскрытия внутренней упаковки хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности набора. Ванночки рекомендуется протереть спиртом и ополоснуть дистиллированной водой.

Растворы № 3, № 6,  $K^+$  и  $K^-$ , конъюгат готовы к применению. Флакон с раствором № 3 перед использованием обязательно интенсивно встряхнуть.

#### 7.1.1. Приготовление рабочего раствора № 2.

10 мл концентрата раствора № 2 интенсивно встряхнуть, перенести в мерную емкость, довести объем до метки 80 мл дистиллированной водой и перемешать.

Готовый раствор хранить не более 4 ч при температуре от 18 °С до 25 °С или 24 ч при температуре от 4 °С до 12 °С.

Если флакон с концентратом раствора № 2 содержит рыхлый комкующийся осадок, то разбить осадок встряхиванием до полного растворения.

#### 7.1.2. Приготовление индикаторного раствора.

Отобрать 9 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавьте 0,2 мл хромогена. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

**ВНИМАНИЕ!** Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с хромогеном, раствором №4 и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегайте также контакта этих реагентов с металлами.

## 7.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

Все операции с полосками нитроцеллюлозных мембран проводить с использованием пластмассового пинцета.

Обратить внимание, чтобы при инкубации и промывании полоски мембран были полностью погружены в жидкость, а реагенты не переливались через бортики канавок во избежание смешивания. После окончания отдельных стадий реакции и промывок все растворы необходимо тщательно удалять при помощи насоса или автоматической пипетки. Следить, чтобы капли влаги не оставались под мембраной. При необходимости осторожно приподнять мембрану пинцетом и удалить из-под нее остатки влаги.

Обратить внимание, чтобы растворы не попадали внутрь пипетки.

**Процедура проведения анализа с 2-часовой инкубацией с образцами.**

7.2.1. Необходимое количество полосок мембран извлечь из пробирки и поместить по одной в каждую канавку планшета. Внести в каждую канавку по 1 мл раствора № 3 так, чтобы мембраны погрузились в раствор. Поместить планшет на качающее устройство и выдержать 10 мин при температуре от 20 °С до 25 °С в таком режиме качания, чтобы полоски мембран были полностью погружены в жидкость, а реагенты не переливались через бортики канавок во избежание смешивания. Например, при использовании орбитального вращающего устройства это достигается при частоте вращения 160 об/мин и амплитуде кругового движения не менее 13 мм или частоте 90 об/мин и амплитуде не более 80 мм.

7.2.2. Не удаляя раствор, внести в канавку планшета, предназначенную для исследования положительного контроля, 20 мкл  $K^+$ , в канавку планшета, предназначенную для исследования отрицательного контроля, 20 мкл  $K^-$ . В остальные канавки внести по 20 мкл испытуемых образцов сывороток или плазмы крови. При внесении каждого (исследуемого и контрольного) образца необходимо регистрировать в протоколе анализа номер соответствующей полоски мембраны.

Каждую пробу вносить в соответствующую канавку планшета новым наконечником. Внесение образцов сывороток должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием автоматической пипеткой.

Заклеить занятые канавки липкой пленкой и поместить планшет с мембранами на качалку. Выдержать 2 ч при температуре от 20 до 25 °, покачивая планшет как описано в п.7.2.1.

7.2.3. Удалить жидкость из канавок планшета (с этой целью здесь и далее используйте лабораторный вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку). Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, после чего раствор сразу удалить.

7.2.4. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, выдержать 5 мин, раствор удалить. Операцию повторить.

7.2.5. Внести в каждую канавку по 1 мл конъюгата. Выдержать 1 ч при температуре от 20 до 25 °С, покачивая планшет как описано в п.7.2.1.

7.2.6. Конъюгат удалить. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2 (см. п.7.1.1.), раствор сразу удалить.

**Промывки и удаление жидкости после реакции с конъюгатом требуют особого внимания, т.к. даже следы конъюгата при контакте с субстратом могут привести к неспецифическому окрашиванию всей мембраны, а не отдельных полос.**

7.2.7. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, выдержать 5 мин, жидкость удалить. Операцию повторить.

7.2.8. Быстро промыть мембраны дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку по 1 мл и сразу же удаляя. После промывки всех мембран тщательно удалить из канавок остатки воды.

7.2.9. Внести в каждую канавку по 1 мл свежеприготовленного индикаторного раствора (см. п.7.1.3.). Выдержать, покачивая планшет (см. п.7.2.1.), 15 мин при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте (например, накрыв планшет крышкой). Жидкость удалить.

7.2.10. Внести в каждую канавку по 1 мл раствора № 6, выдержать 5 мин. Раствор удалить. Дважды тщательно промыть мембраны дистиллированной водой объемом не менее 2 мл.

7.2.11. Положить полоски мембран на лист фильтровальной бумаги и, **не промокая их**, поместить в защищенное от света место до полного высыхания. Учет результатов следует проводить сразу же после полного высыхания мембран.

**ВНИМАНИЕ! Не заклеивать окрашенные линии на мембранах во избежание их обесцвечивания.**

7.2.12. Процедура проведения анализа с 18-часовой инкубацией с образцами.

В этом более чувствительном варианте исследования следует изменить только следующие параметры проведения реакции:

а) Исследуемые и контрольные образцы вносить так же, как описано в п.7.2.2, но **увеличить** длительность инкубации до 18-20 часов;

б) Вносить в каждую канавку по 1 мл конъюгата. Выдержать 30 мин при температуре от 20 до 25 °С, покачивая планшет как описано в п.7.2.1.

## **8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ**

Учет результатов осуществлять визуально по окрашиванию участков мембран с иммобилизованными вирусоспецифическими и контрольными антигенами. Регистрации подлежит окрашивание любой интенсивности.

8.1. Учет результатов исследования проводить при соблюдении следующих условий:

а) контрольные сыворотки  $K^+$  и  $K^-$  дают фиолетово-синее окрашивание в области линий на полосках мембран (рис. 1) **СТРОГО В СООТВЕТСТВИИ** с Таблицей 1;

**Таблица 1.** Окрашивание полос антигенов при анализе контрольных сывороток.

№ линии	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
<b>Наименование антигена</b>	Core 1	Core 2	NS3	NS4	NS5	K <sub>AG</sub>	K <sub>P</sub>
<b>K<sup>-</sup></b>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	есть
<b>K<sup>+</sup></b>	есть	есть	есть	есть	есть	нет	есть

б) на полосках мембраны при анализе исследуемых образцов четко окрашена линия № 7 (K<sub>P</sub>: контрольный антиген правильности проведения реакции).

При получении иных результатов исследование считается выполненным некорректно и его следует повторить.

8.2. Интенсивность окрашивания линий №№ 1-5, содержащих вирусоспецифические антигены, необходимо сравнить с интенсивностью окрашивания линии № 6 (K<sub>AG</sub>: контрольный антиген специфичности реакции). Окрашивание каждой из линий №№ 1-5 следует считать **достоверно специфическим**, если интенсивность ее окрашивания заметно превышает интенсивность окрашивания линии № 6. В большинстве случаев линия № 6 остается совсем неокрашенной, что говорит об отсутствии неспецифической реакции исследуемого образца с иммуносорбентом.

8.3. Интерпретацию результатов анализа исследуемого образца следует проводить в соответствии с окрашиванием линий на полосках мембран:

Результат анализа образца учитывать как положительный, если произошло окрашивание как минимум двух линий из №№ 1-5 (рис. № 1).

Результат анализа образца учитывать как отрицательный, если не произошло окрашивания ни одной из линий №№ 1-5.

При наличии окрашивания только одной из пяти линий №№ 1-5 результат учитывать как неопределенный.

8.4. Если исследование образца проводилось по варианту с 2-часовой инкубацией образцов и получен неопределенный результат, анализ такого образца нужно повторить по схеме с увеличенным временем инкубации в соответствии с п. 7.2.12.

8.5. При получении неопределенного результата после исследования образца по схеме с 18-часовой инкубацией рекомендуется повторное взятие крови через 3-4 недели и новое исследование на появление антител к антигенам ВГС. При повторном получении неопределенного результата исследования образец рекомендуется исследовать дополнительно другими методами.

**Примечание:** В случае исследования сывороток стандартной панели ОСО 42-28-310-02П результаты учитывайте в соответствии с паспортом на использованную серию стандартной панели. Допускается окрашивание линий на отдельных полосках мембран с очень слабой интенсивностью в связи со слабой реактивностью сывороток стандартных панелей.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9 °С до 30 °С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждениях.

Рекламации на качество набора необходимо направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

## **10. СРОК ГОДНОСТИ.**

Срок годности набора - 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.