

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ КОНФИРМАТОРНАЯ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С
МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА
«Белар-ВГС-АТ/ИБ»
инструкция по применению**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система диагностическая подтверждающая предназначена для одновременного выявления антител к белкам Core, NS3, NS4, NS5 вируса гепатита С в сыворотке крови человека методом иммунного блоттинга. Набор рассчитан на проведение 12 исследований, включая контроли.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест-система «Белар-ВГС-АТ/ИБ» представляет собой набор, основой которого являются рекомбинантные антигены, представляющие собой антигензначимые участки белков Core, NS3, NS4, NS5 вируса гепатита С (ВГС), иммобилизованные на нитроцеллюлозной мембране.

Основным свойством диагностической тест-системы является ее способность выявлять в сыворотках крови человека антитела к ВГС посредством их взаимодействия с иммобилизованными на мембране специфическими рекомбинантными антигенами. Антитела к различным белкам ВГС, если они присутствуют в образцах, специфически связываются с гомологичными антигенами, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране (стрипе), образовавшиеся комплексы антиген-антитело проявляются в местах иммобилизации антигенов в виде коричневых полос после внесения конъюгата и инкубации с хромогеном. Время проведения исследования составляет 4 часа.

3. СОСТАВ НАБОРА

3.1 планшет на 12 ячеек с иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране антигенами	1 шт.
3.2 «К ⁺ » - контроль прохождения всех стадий реакции	1 фл. (90 мкл)
3.3 «К ⁻ » - сыворотка, не содержащая антител к вирусу гепатита С	1 фл. (50 мкл)
3.4 концентрат раствора ФСБ с Твин 20 (ФСБ-Т)	1 фл. (5 мл)
3.5 бычий сывороточный альбумин (БСА)	1 фл. (200 мг)
3.6 антивидовой конъюгат	1 фл. (20 мкл)
3.7 концентрат субстратного буферного раствора (СБР)	1 фл. (5 мл)
3.8 3, 3' – диаминобензидин тетрагидрохлорид (ДАБ)	1 фл. (1 табл.)
3.9 перекись водорода	1 фл. (0,5 мл)
3.10 контрольный стрип	1 шт.
3.11 пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл	12 шт.
3.12 пробирка на 15 мл с завинчивающейся крышкой	1 шт.
3.13 инструкция по применению	1 шт.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Исследование образцов сыворотки крови проводится в соответствии с санитарными нормами и правилами «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-

патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2. Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.14-20-2005.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

5.1 Вода дистиллированная.

5.2 Микродозаторы автоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл.

5.3 Посуда мерная на 100 мл.

5.4 Миксер-качалка (шейкер-инкубатор).

5.5 Пинцет.

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Перед проведением анализа извлечь набор из холодильника (кроме ДАБ, п. 3.8) и выдержать все компоненты набора при температуре 23-25°C не менее 30 минут. При наличии кристаллического осадка в растворах ФСБ-Т (3.4) и СБР (п. 3.7) увеличить время выдержки до полного растворения кристаллов.

6.1 Раствор № 1 (ФСБ-Т). Содержимое флакона с концентратом раствора ФСБ-Т (п. 3.4) перенести в мерную посуду и довести объем до 100 мл дистиллированной водой. Тщательно перемешать. Применяется для отмывания стрипов и приготовления раствора № 2. Хранение: до 72 часов при $(6\pm 2)^\circ\text{C}$.

6.2 Раствор № 2 (ФСБ-Т-БСА). Во флакон с БСА (п. 3.5) внести 20 мл раствора № 1 (п. 6.1). Тщательно перемешать. Применяется для разведения исследуемых сывороток крови и конъюгата. Хранение: до 24 часов при $(6\pm 2)^\circ\text{C}$.

6.3 Раствор № 3 (раствор конъюгата) готовится непосредственно перед внесением в ячейки планшета. Для приготовления раствора конъюгата в прилагаемую 15 мл пробирку с завинчивающейся крышкой (п. 3.12) внести 8 мл раствора № 2 (ФСБТ-БСА) и добавить 18 мкл антивидового конъюгата (п.3.6), тщательно перемешать переворачиванием 30-50 раз. Хранению не подлежит.

6.4 Раствор № 4 (СБР). Содержимое флакона с концентратом субстратного буферного раствора (п. 3.7) перенести в мерную посуду и довести объем до 100 мл дистиллированной водой, тщательно перемешать. Раствор применяется для отмывания стрипов перед добавлением субстрат-индикаторного раствора и для приготовления субстрат-индикаторного раствора. Хранится в течение 1 месяца при $(6\pm 2)^\circ\text{C}$.

6.5 Раствор № 5 (субстрат-индикаторный раствор). Флакон с ДАБ (п. 3.8) извлечь из морозильной камеры и за 20-30 мин до использования добавить 15 мл раствора № 4 (п. 7.4), тщательно и осторожно перемешать до полного растворения таблетки (15 - 20 мин), раствор может приобрести светло-коричневую окраску. Непосредственно перед внесением в ячейки планшета добавить во флакон с ДАБ 12 мкл перекиси водорода (п. 3.9). Тщательно перемешать (переворачивая флакон 30 - 50 раз). Возможно **усиление окраски раствора**, что не влияет на его качество. Раствор защищать от прямого действия света. Хранению не подлежит.

7. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И К⁻

При проведении анализа не использовать гемолизованные, мутные сыворотки крови человека. При наличии в анализируемых образцах осадка удалить его центрифугированием 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при 18-25°C.

Инкубирование с исследуемыми сыворотками крови человека и конъюгатом проводить при температуре не ниже 23-25°C с использованием миксера-качалки (шейкера-инкубатора).

Образцы для анализа хранятся при температуре (+6±2)°C не более 72 ч. При необходимости более длительного хранения образцы замораживают в аликвотах и хранят при температуре – 20 – 70°C.

7.1 Подготовка исследуемых образцов (сывороток крови человека) и сыворотки (п. 3.3), не содержащей антител к ВГС (К⁻), проводится следующим образом: пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл (п. 3.11) пронумеровать соответственно нумерации стрипов (№1 – для К⁻, №№ 2-12 – для исследуемых образцов) и внести в них по 600 мкл раствора №2 (п. 6.2). Добавить в каждую пробирку (включая К⁻) по 6 мкл контроля прохождения всех стадий реакции (К⁺) (п. 3.2), затем внести туда же по 6 мкл исследуемых сывороток соответственно нумерации, в пробирку с К⁻ соответственно внести 6 мкл сыворотки, не содержащей антител к ВГС (п. 3.3), тщательно перемешать, переворачивая пробирки не менее 30 раз, осадить капли с внутренней поверхности крышки и стенок пробирки путем кратковременного центрифугирования 3-5 с. Подготовленные образцы хранению не подлежат.

8. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

8.1 Стрипы в ячейках планшета должны быть расположены рабочей поверхностью вверх, при этом номера на них должны быть ясно видны. **Обязательно при проведении исследования использовать один стрип для «К⁻» - образца – сыворотки, не содержащей антител к вирусу гепатита С.**

8.2 Все стадии анализа (инкубирование с сыворотками, конъюгатом, отмывки), проводить при температуре не ниже 23-25°C с использованием миксера-качалки (шейкера-

инкубатора) с частотой от 55 до 65 об/мин. таким образом, чтобы стрипы, двигаясь взад-вперед в ячейках, были полностью погружены в раствор. Не допускать подсыхания стрипов и разбрызгивания раствора.

8.3 Удалять растворы из ячеек следует слегка наклонив планшет, осторожно погрузив наконечник в угол ячейки, не касаясь стрипов.

8.4 На всех стадиях проведения анализа планшет должен быть накрыт крышкой.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1 Внести в ячейку со стрипом для К⁻ (№1) 600 мкл подготовленной сыворотки К⁻ (п. 8.1). Внести в пронумерованные ячейки со стрипами (№№ 2-12) по 600 мкл подготовленных для исследования образцов сывороток крови человека (п. 8.1) соответственно нумерации. Инкубировать 2 часа при 23-25°C, постоянно покачивая. Удалить раствор после инкубации.

9.2 Внести в каждую ячейку по 600 мкл раствора № 1 (ФСБ-Т) (п. 7.1). Отмыть стрипы 3 раза, постоянно покачивая. Время каждой отмывки 3 минуты. Тщательно удалять остатки раствора после каждой отмывки.

9.3 Внести в каждую ячейку по 600 мкл подготовленного раствора конъюгата (п. 7.3). Инкубировать 1 час при 23-25°C, постоянно покачивая. Удалить раствор после инкубации.

9.4 Внести в каждую ячейку по 600 мкл раствора № 1 (ФСБ-Т) (п. 7.1). Отмыть стрипы 2 раза, постоянно покачивая. Время каждой отмывки 3 минуты. Тщательно удалять остатки раствора после каждой отмывки. Внести в каждую ячейку по 600 мкл раствора № 4 (п. 7.4) и отмыть 1 раз в течение 3 минут при покачивании. Тщательно удалить остатки раствора.

9.5. Внести в каждую ячейку по 600 мкл раствора № 5 (субстрат-индикаторный раствор) (п.7.5), защищая стрипы от прямого действия света и постоянно покачивая. **По мере появления** коричневых полос (от 1-2 сек до 5 мин), **быстро** удалять раствор, используя пипетку, и отмывать стрипы в 600 мкл дистиллированной воды 5-6 раз по 3 минуты для остановки ферментативной реакции. Осторожно, не касаясь поверхности стрипа, продвинуть его пинцетом к краю ячейки и поместить на фильтровальную бумагу. Высушить стрипы между двумя слоями фильтровальной бумаги. Стрипы необходимо защищать от действия света.

10. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов анализа проводится визуально после полного высыхания стрипов. Каждый анализируемый стрип сопоставляется с прилагаемым к набору контрольным стрипом, отображающим расположение рекомбинантных антигенов и контролей, и стрипом, который инкубировался с сывороткой (К⁻), не содержащей антител к вирусу гепатита С.

10.1 Результаты оценивают при соблюдении следующего условия: на каждом стрипе отмечается коричневое окрашивание в местах расположения контролей К1 (контроль неспецифического связывания) и К2 (контроль прохождения всех стадий реакции). Интенсивность окраски К2 должна быть больше, чем интенсивность окраски К1.

10.2 Отмечают полосы преципитации в области расположения рекомбинантных антигенов в сравнении с контрольным стрипом.

10.3 Для оценки результатов для каждого исследуемого образца осуществляют сравнение интенсивности окраски каждой из проявившихся полос преципитации антиген-антитело (специфическая полоса) с контролем К1 этого же стрипа.

10.4 Образец учитывается как отрицательный, если на стрипе присутствуют контроли К1 и К2, а полосы в зоне расположения рекомбинантных антигенов отсутствуют, либо их окрашивание по интенсивности меньше контрольной полосы К1 этого же стрипа.

Образец учитывается как положительный, если на стрипе присутствуют полосы преципитации в области Core 1 либо Core 2, по интенсивности больших, чем контрольная полоса К1 этого же стрипа. В случае отсутствия полос области белков Core положительными считаются образцы, дающие не менее двух полос преципитации в области расположения специфических антигенов, по интенсивности больших, чем контрольная полоса К1 этого же стрипа.

Образец учитывается, как неопределенный (сомнительный) если интенсивность окрашивания области расположения рекомбинантного(ых) антигена(ов) соответствует интенсивности контрольной полосы К1 этого же стрипа. В данном случае рекомендуется повторное проведение исследования.

11. ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система «Белар-ВГС-АТ/ИБ» выпускается в виде упакованного набора. Один набор рассчитан на проведение 12 анализов, включая контроли.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при $(6\pm 2) ^\circ\text{C}$ (кроме ДАБ, который хранится при $(-20\pm 2) ^\circ\text{C}$) и влажности воздуха не выше 60 %. Транспортирование осуществляют при тех же условиях. Срок годности тест-системы – 6 месяцев с даты изготовления.