21289

СОГЛАСОВАНО
Заместитель министра здравоохранения
Республики Беларусь
_____ Е.Н. Андросюк
«__» _____ 20__ г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор РНПЦ
эпидемиологии и микробиологии
_____ В.А. Горбунов
«__» _____ 2020 г.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА М К ЭНТЕРОВИРУСАМ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА «ЭВ-РекИФА-М»

инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
РУП "Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении"
_____ Д.В. Гринько
«__» _____ 2020 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ИНСТРУКЦИЯ по применению
тест-системы диагностической для выявления
антител класса М к энтеровирусам методом иммуноферментного анализа
«ЭВ-РекИФА-М»
(ТУ BY 100558032.188-2010, изм. 2)

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для исследования сывороток крови и ликворов больных при серологической диагностике энтеровирусных инфекций. Рассчитана на проведение 96 исследований в 4-ех постановках (96/4)

ПРИНЦИП ТЕСТА

Основой тест-системы иммуноферментной для выявления антител класса М к энтеровирусам (ЭВ) является рекомбинантный энтеровирусспецифический полипептид, содержащий групповые антигенные эпитопы ЭВ. Основным свойством тест-системы является ее способность выявлять антитела класса М к энтеровирусам в сыворотке крови и ликворе больных за счет их взаимодействия с иммобилизованным на лунках планшета рекомбинантным энтеровирусспецифическим полипептидом. Образованный комплекс антиген-антитело выявляют с помощью иммунопероксидазного коньюгата.

СОСТАВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

- планшет полистирольный из 12 разборных стрипов с иммобилизованным на поверхности лунок рекомбинантным энтеровирусспецифическим полипептидом		1 шт.
- ПК - сыворотка крови человека, содержащая IgM к ЭВ. Пористая масса кремового цвета с желтовато-розовым оттенком, после разведения – слегка опалесцирующая жидкость	**№1**	4 фл.
- ОК - сыворотка крови человека, не содержащая IgM к ЭВ. Пористая масса кремового цвета с желтовато-розовым оттенком, после разведения - слегка опалесцирующая жидкость	**№2**	4 фл.
- Конъюгат антивидовой пероксидазный (конъюгат) Прозрачная бесцветная жидкость.	**№3**	1фл. х 2,0 мл
- ФСТБ - фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор (концентрат (х25), допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°С) Прозрачная бесцветная жидкость.	**№4**	2фл. х 20,0 мл
- ТМБ - тетраметилбензидин (субстратный раствор) Прозрачная бесцветная жидкость.	**№5**	2фл. х 6,0 мл
- Стоп-реагент – раствор серной кислоты Прозрачная бесцветная жидкость.	**№6**	1фл. х 10,0 мл
- Пакет полиэтиленовый с замком zip-lock		1 шт.
- Инструкция по применению		1 шт.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

-термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С (любой марки);

-анализатор иммуноферментный, имеющий светофильтр на 450 нм и 620-650 нм (любой марки), для измерения оптической плотности в планшетах;

-аппарат для промывания планшетов (вошер);

-холодильник/морозильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2 до плюс 8°С и от минус 16 до минус 20°С (любой марки);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

-автоматические пипетки одноканальные переменного объема на (2-20)мкл, (20-200) мкл, (100-1000) мкл (любой марки) и наконечники к ним;

-автоматические пипетки восьмиканальные переменного объема на (50-300)мкл и наконечники к ним;

-посуда лабораторная - мерный стакан или цилиндр объемом 500мл, флаконы объемом 5,0 мл, 50,0 мл, 500,0 мл;

-пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл

-штативы для пробирок (любой марки)

-вода дистиллированная или деионизированная

-перчатки медицинские одноразовые;

-дезинфицирующие средства;

-фильтровальная бумага;

-контейнер для сброса потенциально инфекционных отходов.

Подготовка образцов

Образцы сывороток крови и ликворов отбирают в стеклянную или пластмассовую посуду в объеме не менее 0,2 мл и хранят до анализа не более одной недели при температуре (2-8)°С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре минус 20°С в течение шести месяцев, при температуре минус 70°С в течение двух лет. Не используют сыворотку или ликвор, которые замораживались/оттаивались более трех раз. Размороженные образцы после оттаивания обязательно перемешивают для достижения однородности. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин). Непригодны для анализа образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом.

Требования к промывке

При каждой промывке выполняются следующие операции: полностью удалить содержимое лунок; полностью заполнить лунки промывочным раствором (380±20)мл без переполнения и переливания жидкости в соседние лунки; выдержать раствор в лунках в течение 30 секунд; полностью удалить раствор из лунок. После последней аспирации на поверхности рамки и лунок не должно быть остатков жидкости (удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге). Для промывания планшета рекомендуется использовать вошер, работающий в автоматическом режиме. При отсутствии вошера допускается промывка планшета восьмиканальной автоматической пипеткой.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Реагенты тест-системы и образцы перед анализом должны быть выдержаны при температуре (18-25) °С.

Реагенты, готовые к применению: ТМБ, стоп-реагент.

Хранение: указанные реактивы хранят в течение срока годности тест-системы при температуре (2-8) °С в плотно закрытых пластиковых флаконах.

Реагенты, требующие предварительного разведения:

Планшет полистирольный из 12 разборных стрипов с иммобилизованным на поверхности лунок рекомбинантным энтеровирусспецифическим полипептидом извлекают из пакета. Отбирают необходимое для исследования количество стрипов и вставляют в рамку. Остальные стрипы вновь помещают в пакет из фольги, плотно закрывают.

Хранение: в плотно закрытом пакете при температуре (2-8)°С в течение срока годности тест-системы.

Приготовление промывочного раствора. Перед приготовлением промывочного раствора содержимое флакона с ФСТБ **(№4)** тщательно перемешивают. Необходимый объем ФСТБ разводят в 25 раз соответствующим объемом дистиллированной воды (см. табл. 1)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1 – Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов планшета

Количество стрипов, шт	1	2	**3**	4	5	**6**	7	8	**9**	10	11	**12**
Количество ФСТБ **(№4)**, мл	3	6	**9**	12	15	**18**	21	24	**27**	30	33	**36**
Количество дистиллированной воды, мл	72	144	**216**	288	360	**432**	504	576	**648**	720	792	**864**

и тщательно перемешивают.

Хранение: промывочный раствор стабилен в течение 7 суток при (2-8)°С и 24 часов при (18-25)°С при хранении в чистой плотно закрытой емкости.

Приготовление разведений контрольных образцов. ПК (№1) и ОК (№2) растворяют в 0,5 мл промывочного буферного раствора.

Хранение: после первого использования флаконы с ПК и ОК могут использоваться при повторных постановках. Стабильны при температуре минус (16-20)°С в течение срока годности тест-системы Замораживание-оттаивание более 2-х раз не рекомендуется.

Приготовление разведений исследуемых образцов биологического материала. Образцы сывороток крови разводят в 600 раз промывочным буферным раствором. *(Способ 1:*599 мкл промывочного буферного раствора + 1 мкл сыворотки*. Способ 2 - последовательное разведение сывороток: в эппендорф №1 внести 990 мкл промывочного раствора + 10 мкл сыворотки (разведение в 100 раз). Затем в эппендорф №2 внести 500 мкл промывочного раствора + 100 мкл содержимого эппендорфа №1(конечное разведение в 600 раз*). Образцы ликворов исследуют без предварительного разведения.

Хранение: не более 3 ч при температуре (18-25) °С.

Приготовление раствора конъюгата. Готовят за 8-10 мин до окончания первой инкубации. Перед приготовлением содержимое флакона №3 тщательно перемешивают пипетированием. Затем, в зависимости от количества используемых стрипов (см. табл. 2), необходимый объем конъюгата (№3) переносят в чистый флакон и разводят соответствующим объемом промывочного раствора. Осторожно перемешивают, не допуская вспенивания.

Таблица 2 – Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов планшета

Количество стрипов, шт	1	2	**3**	4	5	**6**	7	8	**9**	10	11	**12**
Количество коньюгата антивидового пероксидазного **(№3)**, мл	0,1	0,2	**0,3**	0,4	0,5	**0,6**	0,7	0,8	**0,9**	0,10	1,1	**1,2**
Количество промывочного раствора, мл	1,0	2,0	**3,0**	4,0	5,0	**6,0**	7,0	8,0	**9,0**	10,0	11,0	**12,0**

Хранение: оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать.

Флакон с конъюгатом (№3) может использоваться при повторных постановках. Стабилен при температуре минус 20°С в течение срока годности тест-системы

ПОСТАНОВКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)

Общая продолжительность анализа – 2 ч 10 мин

- Готовят планшет с необходимым количеством стрипов
- Вносят в лунки планшета по 0,1 мл ПК – в 1-2 лунки (например, А1), ОК – в 2-4 лунки (например, В1, С1). В остальные лунки вносят разведения исследуемых образцов биологического материала (каждого – в 2 лунки).
- Планшет помещают в пакет полиэтиленовый с замком zip-lock и инкубируют в течение 1,0 ч при температуре (37 ± 1)°С.
- Промывают планшет 4 раза промывочным раствором как указано в разделе «Требования к промывке»
- Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл раствора конъюгата.
- Планшет помещают в пакет полиэтиленовый с замком zip-lock и инкубируют в течение 1,0 ч при температуре (37 ± 1)°С.
- Промывают планшет 4 раза промывочным раствором как указано в разделе «Требования к промывке»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл ТМБ (№5).
- Планшет выдерживают в течение 8-10 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.
- Во все лунки планшета вносят по 0,05 мл стоп-реагента (№6) для остановки цветной реакции.
- Не позже чем через 2-3 мин после внесения стоп-реагента проводят фотометрию проб: измеряют величину оптической плотности раствора в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования при двух длинах волн - 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 650 нм.

Параметры проверки пригодности реагентов

Учет и интерпретация результатов анализа осуществляется только в том случае, когда выполняются следующие требования:

1. Показатель оптической плотности (ПОП) в лунках с ОК по результатам фотометрии меньше или равен 0,250 единиц оптической плотности
2. ПОП в лунках с ПК по результатам фотометрии больше или равен 0,420 единиц оптической плотности
3. Соотношение среднего значения ПОП для ПК (ПК ср.) и ОК (ОК ср.) больше 2,1
4. При несоответствии этих показателей тест считается не действительным и его нужно повторить

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитывают среднее значение ПОП в лунках с исследуемыми образцами.

Результат анализа считается отрицательным на выявление IgM к энтеровирусам, если среднее значение ПОП образца ≤ ПОП ОК ср. х2,1

Результат анализа считается положительным на выявление IgM к энтеровирусам, если среднее значение ПОП образца ≥ПОП ОК х2,1

Сам факт обнаружения антител в сыворотке крови не может расцениваться как показатель текущего заболевания. Для подтверждения диагноза результаты этого анализа должны интерпретироваться совместно с другой клинической информацией.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При работе с тест-системой следует применять меры предосторожности в соответствии с требованиями работы с вирусами I-II группы риска: проводить работу в халате, медицинских масках и резиновых перчатках. Стоп-реагент содержит серную кислоту - не допускать попадания на кожу и слизистые.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности тест-системы 12 месяцев с даты изготовления.

Транспортирование тест-системы осуществляют при температуре от 2 до 8°С в течение не более 1 суток. При получении тест-систему необходимо разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение тест-системы осуществляют при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности. Хранение реагента №3 осуществляется при температуре от минус 16 до минус 20°С на протяжении срока годности тест-системы.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности тест-системы;
- контрольные образцы (ОК, ПК), конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от минус 16 до минус 20°С в течение срока годности тест-системы (замораживание-оттаивание более 2-х раз не рекомендуется);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- раствор конъюгата, оставшийся после проведения ИФА, хранению не подлежит и утилизируется;

- ФСТБ, ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности тест-системы;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8°С не более 7 суток, при температуре от 18 до 25 °С - не более 1 суток в чистой плотно закрытой емкости;

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из тест-систем разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСТБ, стоп-реагент).

РАЗРАБОТЧИКИ
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии:
Заведующая лабораторией инфекций
с природным резервуаром,
проф., д-р мед. наук
_____ Т. В. Амвросьева
Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром,
канд.биол.наук
_____ Н. В. Поклонская
Научный сотрудник лаборатории инфекций
с природным резервуаром
_____ З. Ф. Богуш

Научный сотрудник лаборатории инфекций
с природным резервуаром
_____ О. Н. Казинец
«13» 02 2020 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru