УТВЕРЖДАЮ

Главный врач Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

_____ А. Л. Скуранович

«23» 05 2024 г.

ТЕСТ-СИСТЕМА РЕКОМБИНАНТНАЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЭНТЕРОВИРУСОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА «ЭВ-РЕКИФА-АГ»

Инструкция по применению

Минск, 2024

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

НИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

ИНСТРУКЦИЯ
по применению тест-системы рекомбинантной для определения антигенов энтеровирусов методом иммуноферментного анализа «ЭВ-РекИФА-АГ»

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для определения антигенов энтеровирусов (АГ ЭВ) в биологическом материале от пациентов (фекалиях, носоглоточных смывах, ликворах) при диагностике энтеровирусных инфекций, пробах вод (питьевых, поверхностных, сточных), пищевых продуктах при санитарно-вирусологических исследованиях.

Рассчитана на проведение 96 исследований в 4-х постановках (96/4)

ПРИНЦИП ТЕСТА

Основой тест-системы рекомбинантной для определения АГ ЭВ методом иммуноферментного анализа является рекомбинантный энтеровирусный белок, содержащий групповые антигенные эпитопы ЭВ. Основным свойством тест-системы является ее способность определять АГ ЭВ в фекалиях, носоглоточных смывах, ликворах при диагностике энтеровирусной инфекции,и в пробах вод (питьевых, поверхностных, сточных), расфасованных водах, экстрактах пищевых продуктов при санитарно-вирусологических исследованиях. Обнаружение в исследуемых пробах АГ ЭВ происходит за счет их способности конкурировать с рекомбинантным белком, сорбированным на поверхности лунок планшета, за специфическое связывание с гомологичными антителами, присутствующими в кроличьей иммунной иммунной сыворотке, которую вносят в лунки одновременно с исследуемыми пробами. Визуализацию образовавшегося комплекса антиген-антитело проводят с помощью антивидового конъюгата, меченого пероксидазой хрена, дающего желтое окрашивание реакции различной интенсивности при последовательном добавлении тетраметилбензидина и стоп-реагента. При наличии в исследуемой пробе АГ ЭВ интенсивность окраски уменьшается по сравнению с отрицательным контролем. Тест-система рассчитана на 96 исследований.

СОСТАВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

- планшет полистирольный из 12 разборных стрипов с иммобилизованным на поверхности лунок рекомбинантным энтеровирусным белком		1 шт.
- ПК – лиофилированная проба, содержащая АГ ЭВ. Пористая масса кремового цвета, после разведения – прозрачная жидкость	**№1**	4 фл.
- ОК – лиофилизированная проба, не содержащая АГ ЭВ. Пористая масса белого цвета, после разведения – прозрачная жидкость	**№2**	4 фл.
- сыворотка иммунная – лиофилизированная проба, содержащая кроличьи, противоэнтеровирусные антитела). Пористая масса белого цвета, после разведения – прозрачная жидкость	**№3**	4 фл.
- Конъюгат (антивидовой против иммуноглобулинов кролика, меченый пероксидазой) Прозрачная бесцветная жидкость.	**№4**	1фл. х 1,6 мл
- ФСТБ - фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор (концентрат (х25), допустимо образование осадка, полностью	**№5**	2фл. х 20,0 мл

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

растворяющегося при температуре от 35 до 39°С) Прозрачная бесцветная жидкость.		
- ТМБ - тетраметилбензидин (субстратный раствор) Прозрачная бесцветная жидкость.	**№6**	1 фл. х 12,0 мл
- Стоп-реагент – раствор серной кислоты Прозрачная бесцветная жидкость.	**№7**	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 нм (любой марки), для измерения оптической плотности в планшетах;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- холодильник/морозильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2 до плюс 8^0С и от минус 16 до минус 20°С (любой марки);
- 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, 20,0 мл, 500,0 мл;
- пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл;
- штативы для пробирок (любой марки);
- вода дистиллированная или деионизированная;
- вата медицинская гигроскопическая;
- перчатки медицинские одноразовые;
- дезинфицирующие средства;
- фильтровальная бумага;
- ванночки для реагентов;
- контейнер для потенциально инфекционных отходов.

Подготовка исследуемых проб.

- Пробы фекалий. Готовят 10-20 % суспензию на ФСТБ. Допускают также суспендирование в физ. р-ре. Суспензию осветляют центрифугированием (3000 об/мин.), надосадок в течение 5 мин. встряхивают с равным объемом хлороформа, повторяют центрифугирование в том же режиме. Верхнюю фазу дополнительно концентрируют ПЭГ аналогично обработке проб воды. Вируссодержащий осадок тщательно ресуспендируют в том же буферном растворе, составляющем 1/20 исходного объема суспензии, и используют для исследования.

- Носоглоточные смывы. Носоглоточные секреты, полученные с помощью зонд-тампонов, исследуют без дополнительной обработки и разведения.

- Ликворы исследуют без дополнительной обработки и разведения.

- Пробы воды (элюаты), полученные с помощью наборов для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды в системе децентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, поверхностных и сточных вод (ТУ РБ 100558032. 047-2000) или наборов для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства (ТУ РБ 100558032.048-2000) обязательно концентрируют. Для этого ПЭГ-6000 и хлористый натрий добавляют в элюат, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10% и 0,5 М (0,1г и 0,03г на 1 мл элюата, соответственно). Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 18 часов в холодильнике при +4°С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 3 000 об/мин в течение 2 часов. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0, 6 мл ФСТБ и исследуют.

- При отсутствии ПЭГ-6000 можно проводить концентрирование элюатов сульфатом аммония. Используют соль высокой чистоты (чда) из расчета: на 1 мл элюата – 0,4 г сульфата аммония.

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

В центрифужную пробирку, содержащую навеску соли, доливают элюат и тщательно перемешивают до растворения кристаллов. Раствор при этом подкисляется и слегка мутнеет. Затем центрифугируют при 3000 об/мин. в течение 2 часов. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0, 6 мл ФСТБ и исследуют.

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, готовые к применению: ТМБ, стоп-реагент.

Хранение: указанные реактивы хранят в течение срока годности тест-системы при температуре от плюс 2^0С до плюс 8 °С в плотно закрытых пластиковых флаконах.

Реагенты, требующие предварительного разведения:

Приготовление промывочного раствора. Перед приготовлением промывочного раствора содержимое флакона с ФСТБ **(№5)** тщательно перемешивают. Необходимый объем ФСТБ разводят в 25 раз соответствующим объемом дистиллированной воды (см. табл. 1)

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 **(№5)**, 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 от 2^0С до 8°С и 24 часов от 18 °С до плюс 25°С при хранении в чистой плотно закрытой емкости.

Приготовление разведений контрольных образцов и сыворотки иммунной. ПК (№1) и ОК (№2) растворяют в 0,5 мл промывочного буферного раствора. Сыворотку иммунную растворяют в 1,3 мл промывочного буферного раствора.

Приготовление раствора конъюгата. Готовят за 8-10 мин до окончания первой инкубации. Коньюгат достают из морозильной камеры, выдерживают при комнатной температуре 2-3 мин. Перед приготовлением содержимое флакона №4 тщательно перемешивают пипетированием. Затем, в зависимости от количества используемых стрипов (см. табл. 2), необходимый объем конъюгата (№4) 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 **(№4)**, мл	0,1	0,2	**0,3**	0,4	0,5	**0,6**	0,7	0,8	**0,9**	1,0	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 (№4) используют при повторных постановках. Стабилен при температуре от минус 16^0С до миинус 20°С в течение срока годности тест-системы.

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

ПОСТАНОВКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)

Общая продолжительность анализа – 2 ч 10 мин

Готовят планшет с необходимым количеством стрипов. Вскрывают фольгированный пакет, извлекают из пакета. Отбирают необходимое для исследования количество стрипов и вставляют в рамку. Остальные стрипы вновь помещают в пакет из фольги, плотно закрывают. После вскрытия пакета стрипы использовать на протяжении 2-х месяцев.

- Вносят в лунки планшета по 0,05 мл ОК – в 4 лунки (например, A1, B1, C1, D1), по 0,05 мл ПК – в 2 лунки (например, E1, F1). В остальные лунки вносят по 0.05 мл исследуемых образцов биологического материала (каждого – в 2 лунки).
- Во все лунки вносят по 0,05 сыворотки иммунной, осторожно встряхивают для перемешивания.
- 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»
- Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл ТМБ (№5).
- Планшет выдерживают в течение 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 5 мин после внесения стоп-реагента проводят фотометрию проб: измеряют величину оптической плотности раствора в лунках на анализаторе иммуноферментном вертикального сканирования при двух длинах волн - 450 нм и при фоновой 620 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 не меньше или равен 0,8 единиц оптической плотности
2. ПОП в лунках с ПК по результатам фотометрии меньше или равно ПОП ОК/2,5 оптической плотности
3. Соотношение среднего значения ПОП для ОК (ОК ср.) и ПК (ПК ср.) больше или равно 2,5
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 АГ ЭВ, если среднее значение ПОП образца ≥ ПОП ОК ср. /2,1

Результат анализа считается положительным на выявление АГ ЭВ, если среднее значение ПОП образца ≤ ПОП ОК / 2,1

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

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

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°С 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 №4 осуществляется при температуре от минус 16^0С 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 2^0С до 8°С в течение 2-х месяцев.;
- раствор разведенног 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 2^0С до 8°С в течение всего срока годности тест-системы;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от плюс 2^0С до плюс 8°С не более 7 суток, при температуре от плюс 18^0С до плюс 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:

Заведующий лабораторией инфекций с природным резервуаром, д.м.н., проф.
_____ Т.В. Амвросьева
«__»_____2024 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром, к.б.н.
_____ Н.В. Поклонская
«01»__07_____2024 г.

Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____О. Н. Казинец
«01»07_____2024 г.

Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____З. Ф. Богуш
«01»__07_____2024 г.

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