

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

« 17 » Октября 2018 г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор филиала «Медгамал»
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России



Н.Б. Филиппова

« 19 » Октября 2018 г.

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

(Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098 Москва, ул. Гамалеи, 18 тел. (499) 190-44-78, факс (499) 190-66-71

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для дифференциального определения IgM-антител
к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья в сыворотке крови человека
методом иммуноферментного анализа
«ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чик»
по ТУ 21.10.60-064-01894956-2017

Аннотация

В 1950-1960-е годы единичные случаи лихорадки Зика были верифицированы в Египте, Нигерии, Уганде, Индии, Малайзии, Индонезии, Пакистане, Таиланде, Северном Вьетнаме и на Филиппинах, в 1977 г. в Индонезии, в 2007 г. – в Микронезии. В 2013—2014 гг. во время вспышки в Новой Каледонии заболело более 1400 человек, включая 34 случаев, импортированных из Французской Полинезии, где среди 268000 жителей было выявлено 28000 больных. Вспышка 2013-2014 гг. на островах Тихого океана охватила Полинезию, Микронезию, Новую Каледонию, Острова Кука, Восточный Остров, Вануату, Соломоновы острова, Фиджи и Таити.

Циркуляция вируса Зика в Южной Америке впервые была установлена в феврале 2014 г. К маю 2015 г. эпидемия лихорадки Зика в Южной Америке охватила территории Бразилии, Чили, Пуэрто-Рико, Колумбии, Сальвадора, Гватемалы, Мексики, Парагвая, Суринама, Венесуэлы и Доминиканской республики. К концу 2015 г. в Южной Америке было зарегистрировано приблизительно 1 млн. 500 тыс. больных лихорадкой Зика. В настоящее время аутохтонные случаи этого заболевания зарегистрированы в 52 государствах.

В связи с развитием массового туризма, интенсификацией миграционных процессов и деловых связей возникла проблема завозных случаев тропических зоонозных инфекций, в

том числе лихорадок Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья, из тропических стран мира в неэндемичные регионы (в том числе в Российскую Федерацию).

Вирус Зика наряду с вирусами денге, Западного Нила, желтой лихорадки, энцефалита Сент-Луис, японского и клещевого энцефалита и другими относится к семейству Flaviviridae, роду Flavivirus. Исследованные в настоящее время штаммы вируса Зика подразделяются на 3 генотипа: Западно-Африканский, Восточно-Африканский и Азиатский. Эпидемия этого заболевания в Ю. Америке связана с азиатским вариантом.

Основными признаками лихорадки Зика являются: острое начало, лихорадка, сыпь, артралгия, миалгия, головная и ретроорбитальная боли, конъюнктивит, лейкопения, и тромбоцитопения. Эти непатогномотичные симптомы наблюдаются так же при лихорадках денге, Западного Нила и Чикунгунья.

Поэтому, основное значение для их дифференциальной диагностики имеют методы лабораторного обследования больных (главным образом ОТ-ПЦР и ИФА-IgM). Иммуноферментный анализ, используемый для выявления специфических IgM антител к этим вирусам, обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Достаточно сложной является интерпретация результатов дифференциальной серодиагностики этиологически родственных флавивирусных заболеваний в случае вторичной инфекции, наблюдающейся при повторном заражении гетерологичными вирусами этой группы.

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России разработаны набор ИФА-IgM (MAC-ELISA) предназначенный для дифференциальной диагностики лихорадок Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья. Установленная чувствительность тестов ИФА-IgM определяется высокими показателями оптической плотности и титров специфических антител, специфичность - данными обследования сывороток крови больных гомологичными и гетерогенными заболеваниями и здоровых доноров, экспрессность анализа – скоростью получения ответов. Диагностические результаты обследования больных лихорадками денге и Чикунгунья методом ИФА-IgM с применением этого набора коррелируют с данными ОТ-ПЦР.

1. Назначение

Медицинское изделие «Набор реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА- IgM Зика, денге, ЗН, ЧИК» по ТУ 21.10.60-064-1894956-2017 предназначен для качественного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа при проведении диагностических исследований.

Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

Набор предназначен только для однократного применения.

Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

2. Показания к применению

Серологическая диагностика острых лихорадочных заболеваний с подозрением на лихорадку Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья у местных жителей эндемичных регионов или у приезжих лиц.

Определение пропорции клинически выраженных и бессимптомных случаев этих инфекций, включая лихорадку Зика у беременных женщин.

Диагноз лихорадки Зика и время (дата заболевания) беременных женщин могут быть установлены по выявлению специфических IgM антител при клинически выраженных симптомах, характерных для этой инфекции и соответствующего эпиданамнеза.

3. Противопоказания

Противопоказания и ограничения к применению медицинского изделия для диагностики лихорадки Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья у всех категорий больных с подозрением на эти инфекции отсутствуют.

4. Характеристика набора

4.1. Принцип метода

На поверхности лунок полистиролового планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела против иммуноглобулинов человека класса М.

Каждый образец исследуется в **восьми** параллельных лунках (4 специфические лунки на каждый вирус и 4 с контрольным (нормальным) антигеном, обозначаемых в дальнейшем как З-лунка (Зика), Д-лунка (денге), Н-лунка (Западный Нил), Ч-лунка (Чикунгунья) и К-лунка (контрольный антиген). При инкубации образцов сывороточные антитела IgM связываются с анти-М антителами, иммобилизованными в лунках планшета. На следующей стадии в лунки добавляют специфические антигены вирусов Зика, денге, Западного Нила, Чикунгунья (З-лунка, Д-лунка, Н-лунка, Ч-лунка) и контрольный антиген (К-лунка). Если в исследуемом образце присутствуют IgM-антитела к одному из четырех вирусов, то в процессе инкубации вирусный антиген специфически связывается с сывороточными антителами класса М, в лунке с контрольным антигеном связывания не происходит. После отмывки вносят конъюгаты, представляющие собой мышинные поликлональные антитела к вирусам Зика, денге, ЗН и Чикунгунья, меченные пероксидазой хрена. После удаления несвязанных молекул конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации IgM-антител в образце. После остановки

реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм).

Положительный контрольный образец инаktivированный «K^{+(Зика)}М» - сыворотка крови человека, содержащая антитела IgM к вирусу Зика и не содержащая антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg, антител к вирусам денге, Западного Нила, Чикунгунья, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Инаktivирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч;

Положительный контрольный образец инаktivированный «K^{+(денге)}М» - сыворотка крови человека, содержащая антитела IgM к вирусу денге и не содержащая антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg, антител к вирусам Зика, Западного Нила, Чикунгунья, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Инаktivирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч;

Положительный контрольный образец инаktivированный «K^{+(ЗН)}М» - сыворотка крови человека, содержащая антитела IgM к вирусу Западного Нила и не содержащая антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg, антител к вирусам Зика, денге, Чикунгунья, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Инаktivирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч;

Положительный контрольный образец инаktivированный «K^{+(Чик)}М» - сыворотка крови человека, содержащая антитела IgM к вирусу Чикунгунья и не содержащая антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg, антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Инаktivирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч;

Отрицательный контрольный образец инаktivированный «K⁻М» - сыворотка крови человека, инаktivированная, не содержащая антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg, антител IgM к вирусам Зика, денге, Западного Нила, Чикунгунья, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Инаktivирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч;

Специфический антиген вируса Зика «АГ_{Зика}», инаktivированный β-пропиолактоном с последующим подтверждением инаktivации с помощью контрольного заражения лабораторных животных;

Специфический антиген вируса денге «АГ_{денге}», инаktivированный β-пропиолактоном с последующим подтверждением инаktivации с помощью контрольного заражения лабораторных животных;

Специфический антиген вируса Западного Нила «АГ_{ЗН}», инаktivированный β-пропиолактоном с последующим подтверждением инаktivации с помощью контрольного заражения лабораторных животных;

Специфический антиген вируса Чикунгунья «АГ_{чикунг}», инаktivированный β-пропиолактоном с последующим подтверждением инаktivации с помощью контрольного заражения лабораторных животных;

Контрольный антиген «АГ N» – приготовлен из мозга нормальных (неинфицированных мышей) не содержащий антигенов вирусов Зика, денге, Западного Нила, Чикунгуны, что подтверждено ИФА;

Конъюгат Зика - поликлональные антитела мыши к вирусу Зика, меченные пероксидазой хрена;

Конъюгат денге - поликлональные антитела мыши к вирусу денге, меченные пероксидазой хрена;

Конъюгат Западного Нила - поликлональные антитела мыши к вирусу Западного Нила, меченные пероксидазой хрена;

Конъюгат Чикунгуны - поликлональные антитела мыши к вирусу Чикунгуны, меченные пероксидазой хрена.

Концентрат промывочного буфера (×50) – 50-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином;

Концентрат ИФА буфера (×10) - 10-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, казеинатом натрия и красителем феноловым красным;

Раствор для разведения хромогена (Раствор В) – водный раствор лимонной кислоты, содержащий 0,36 % перекиси водорода;

Хромоген (Раствор А) - 5 mM раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина;

Стоп-реагент – 0,5 M раствор кислоты серной.

4.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты, упакованные в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Планшет разборный 96-луночный «Иммуносорбент»	Разборный полистироловый 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	2 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный «K ⁺ (Зика)M»	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.	0,1 мл 1 пробирка, коричневая крышка
Положительный контрольный образец инактивированный «K ⁺ (Денге)M»	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.	0,1 мл 1 пробирка, желтая крышка
Положительный контрольный образец инактивированный «K ⁺ (ЗН)M»	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.	0,1 мл 1 пробирка, зеленая крышка
Положительный контрольный образец	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.	0,1 мл 1 пробирка,

Компонент	Описание	Количество
инактивированный «К ⁺ (Чик)М»		красная крышка
Отрицательный контрольный образец инактивированный «КМ»	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость..	0,4 мл 1 пробирка бесцветная крышка
Специфический антиген «АГ _{Зика} »	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,1 мл 1 пробирка, коричневая крышка
Специфический антиген «АГ _{денге} »	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,1 мл 1 пробирка, желтая крышка
Специфический антиген «АГ _{ЗН} »	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,1 мл 1 пробирка, зеленая крышка
Специфический антиген «АГ _{Чикунг} »	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,1 мл 1 пробирка, красная крышка
Контрольный антиген «АГ N»	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,4 мл 1 пробирка бесцветная крышка
Конъюгат Зика	Прозрачная жидкость	0,1 мл 1 пробирка, коричневая крышка
Конъюгат денге	Прозрачная жидкость	0,1 мл 1 пробирка, желтая крышка
Конъюгат ЗН	Прозрачная жидкость	0,1 мл 1 пробирка, зеленая крышка
Конъюгат Чикунгунья	Прозрачная жидкость	0,1 мл 1 пробирка, красная крышка
Концентрат промывочного буфера (×50)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от +35 °С до +37 °С в течение 30 минут	20 мл 1 флакон
Концентрат ИФА буфера (×10)	Опалесцирующая густая жидкость красного цвета, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	10 мл 1 флакон
Раствор для разведения хромогена (Раствор В)	Прозрачная бесцветная жидкость.	20 мл 1 флакон

Компонент	Описание	Количество
Хромоген (Раствор А)	Прозрачная бесцветная или слегка желтая жидкость	5 мл 1 флакон
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	20мл 1 флакон
Инструкция по применению	-	1 шт.
Паспорт	-	1 шт.
Пленка для заклеивания планшетов	Прозрачная клейкая пленка	2 шт.

Один набор рассчитан на проведение 24 анализов, включая контрольные.

5. Аналитические и диагностические характеристики набора

5.1. Аналитическая чувствительность набора по сывороткам стандартной панели предприятия (СПП), содержащим IgM-антитела к вирусам Зика, денге, ЗН и Чикунгунья, составляет 100 %.

Аналитическая специфичность набора по сывороткам СПП, не содержащим IgM-антител к вирусам Зика, денге, ЗН и Чикунгунья, составляет 100 %.

Диагностическая чувствительность набора реагентов «ИФА- IgM Зика, Денге, ЗН, Чик», определенная в соответствии с Приложением В к «Методическим рекомендациям по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации» (Москва, 2016 г.), на образцах СПП, являющихся сыворотками крови больных лихорадками Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья, составляет от 94,4 % до 100 % с доверительной вероятностью 90 %. Диагностическая специфичность набора реагентов «ИФА- IgM Зика, Денге, ЗН, Чик», на образцах СПП, являющихся сыворотками крови здоровых людей, находится в интервале от 95,5 % до 100 % с доверительной вероятностью 90 %.

Влияние потенциально интерферирующих факторов: билирубин (41 мкМ/мл), гемоглобин (160 г/л), сывороточный альбумин (80 г/л), холестерин (17,0 мМ/л), ревматоидный фактор (384 мг/мл) на результаты исследования не выявлено.

Перекрестные реакции при обследовании сывороток больных флавивирусными инфекциями отсутствуют или носят дифференцирующий характер, при обследовании сывороток больных лихорадкой Чикунгунья - отсутствуют.

Данные по использованию набора у лиц с нарушением иммунного статуса (СПИД и другие иммунодефициты, сывороточная болезнь, парапротеинемические лейкозы) отсутствуют.

5.2 Лабораторный контроль качества набора заключается в проверке соответствия его технических характеристик данным, указанным в паспорте на серию, и осуществляется с

использованием контрольных образцов, входящих в состав набора. Контроль проводится визуально и методом ИФА в соответствии с инструкцией по применению.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Набор может быть использован к применению персоналом клинико-диагностических лабораторий, имеющих разрешение для работы с возбудителями особо опасных инфекций, II - III группы патогенности. Класс образующихся отходов в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 при утилизации набора – класс Б.

Контрольные образцы и специфические антигенные компоненты набора реагентов полностью инактивированы и не содержит инфекционного вируса, однако при обследовании клинических материалов необходимо соблюдать меры предосторожности и обращаться с исследуемыми образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, как с потенциально инфекционными в соответствии Санитарными правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (с изменениями на 29 июня 2011 года):

- работать в резиновых перчатках, за защитным экраном;
- 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.

Стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты) обладает раздражающим действием. Следует избегать его разбрызгивания. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

7. Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

- дистиллированная или деионизированная вода;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;

- пипетки одноканальные автоматические 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 %);

- пипетки 8- или 12-канальные автоматические со сменными наконечниками позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 100 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- центрифуга настольная на (3-10) тыс. об/мин для получения и осветления образцов;

- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для получения, хранения, осветления образцов;

- мерный стакан или цилиндр вместимостью (250-500) мл;

- мерная посуда вместимостью до 25 мл;

- воздушный термостат на +37 °C;

- аппарат для промывания планшетов;

- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм);

- контейнер для сброса твердых отходов;

- контейнер для слива использованных жидкостей;

- автоклав для инактивации отходов;

- вата гигроскопическая;

- фильтровальная бумага.

8. Анализируемые образцы

Сбор, обработку, хранение и транспортировку сывороток крови больных с подозрением на арбовирусные инфекции осуществляют в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (с изменениями на 29 июня 2011 года), СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» и методических указаний МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случае выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

Забор материала от больных производится медицинскими работниками стационара, компетентными в вопросах диагностики особо опасных инфекционных болезней и биологической безопасности при работе с возбудителями III - IV групп патогенности.

Для серологических исследований, основанных на выявлении нарастания титра антител в парных сыворотках, образцы забирают в острый период заболевания, а затем через 2-3 недели.

С целью получения сывороток забор крови производят натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в объеме 5 мл. одноразовым шприцем в пластиковые одноразовые пробирки без антикоагулянтов. Отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученную сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл) сыворотка не должна быть гемолизированной.

Образцы сыворотки крови, предназначенные для серологического обследования следует сохранять при температуре от +2 °С до +6 °С в течение 7 суток, при температуре от -18 °С до -20 °С в течение года. Не рекомендуется повторное замораживание-оттаивание проб. Подобный температурный режим предусмотрен и для транспортировки материала в термоконтейнерах. Обследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившимся без заморозки, может привести к ложным результатам.

ВНИМАНИЕ!

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

При инкубациях не располагать планшеты стопкой!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более четырех планшетов.

Существенное значение имеет температурный режим постановки опытов. Он должен находиться в пределах от 20 °С до 28 °С. Более низкие или высокие показатели температуры оказывают влияние на скорость проявления реакции и могут исказить оценку результатов.

9. Приготовление реагентов (для проведения 24 анализов)

Условия и сроки хранения компонентов набора после даты вскрытия индивидуальной упаковки приведены в Таблице № 1:

Таблица № 1

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	От +2 °С до +8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
Специфические и контрольный антигены	От +2 °С до +8 °С	8 недель
Положительные контрольные образцы, К ⁻ М, конъюгаты	От +2 °С до +8 °С	8 недель
Концентрат промывочного буфера, концентрат ИФА буфера, Раствор А, Раствор В, Стоп-реагент	От +2 °С до +8 °С	До окончания срока годности набора

Перед началом работы компоненты набора необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут.

9.1. Приготовление промывочного буфера

Содержимое флакона «концентрат промывочного буфера» интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов, его следует прогреть при температуре от +35 °С до +37 °С до полного растворения. Все содержимое флакона перенести в мерную емкость, довести объем до метки 1 л дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 120 ч при температуре от +4 °С до +12 °С или 24 часа при температуре от +18 °С до +24 °С.

9.2. Приготовление ИФА буфера

Содержимое флакона «Концентрат ИФА буфера» разводят в 10 раз (1:9) дист. водой.

Для проведения анализа в объеме одного планшета потребуется около 30 мл готового ИФА буфера.

9.3. Подготовка контрольных (К⁺М, К⁻М) образцов.

В 4 подписанные микропробирки вносят по 0,5 мл ИФА буфера. Затем переносят в соответствие с подписями контрольные сыворотки по 5 мкл из флаконов К⁺(Зика)М, К⁺(денге)М, К⁺(ЗН)М и К⁺(Чик)М.

Добавляют 20 мкл контрольной отрицательной сыворотки из флакона К⁻М к 2,0 мл ИФА буфера (разведение 1:100).

9.4. Подготовка испытуемых образцов для качественного анализа

В микропробирку вносят 1,0 мл ИФА буфера. 10 мкл исследуемой сыворотки добавляют в микропробирку (разведение 1:100).

Разведенные испытуемые образцы не хранить!

9.5. Приготовление раствора специфического антигена

К 30 мкл каждого специфического антигена добавить 1,5 мл ИФА буфера (разведение 1:50).

9.6. Приготовление раствора контрольного антигена

К 100 мкл контрольного антигена (АГ N) добавить 5 мл раствора ИФА буфера (разведение 1:50).

Разведенные специфический и контрольный антигены не хранить!

9.7. Приготовление рабочего разведения конъюгатов

Из пробирок с конъюгатами отобрать по 50 мкл в чистые емкости и добавить по 2,5 мл ИФА буфера (разведение 1:50). Тщательно перемешать пипетированием.

Готовый раствор рабочего разведения конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от +9 °С до +25 °С в защищенном от света месте.

9.8. Приготовление индикаторного раствора

Для приготовления 10 мл индикаторного раствора к 8,0 мл Раствора В добавить 2,0 мл Раствора А. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

10. Проведение анализов

Освободить планшеты из упаковки и оставить в каретке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в Таблице № 1.

10.1. Качественный анализ

10.1.1. Внесение контрольных и испытуемых образцов сывороток

Каждый образец исследуется в **восьми** параллельных лунках, обозначаемых в дальнейшем как З-лунка, Д-лунка, Н-лунка, Ч-лунка и К-лунка (см. Рис. № 1).

Во все лунки первого стрипа (вертикального ряда) (см. Рис. № 1) внести по 50 мкл разведенного 1:100 (см. п. 9.3) отрицательного образца сыворотки К⁻М.

В лунки второго вертикального ряда внести по 50 мкл приготовленные (см. п. 9.3) положительные контрольные образцы: в З- и К-лунки (лунки А и В) соответственно К^{+(Зика)}М;

в Д- и К-лунки (лунки С и Д) – К^{+(деснге)}М;

в Н- и К-лунки (лунки Е и F) – К^{+(3Н)}М;

в Ч- и К-лунки (лунки G и H) – К^{+(Чик)}М (см. Рис. № 1).

Каждый испытуемый, разведенный 1:100 образец (см. п. 9.4) сыворотки внести во все лунки одного вертикального ряда (стрипа) с № 3 по № 12, один ряд на сыворотку.

Рекомендуемая схема внесения контрольных и испытуемых образцов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	К М	К ^{-(Зика)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	З-лунки
B	К М	К ^{-(Зика)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	К-лунки
C	К М	К ^{-(денге)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	Д-лунки
D	К М	К ^{-(денге)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	К-лунки
E	К М	К ^{-(ЗН)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	Н-лунки
F	К М	К ^{-(ЗН)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	К-лунки
G	К М	К ^{-(Чик)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	Ч-лунки
H	К М	К ^{-(Чик)} М	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	К-лунки

Планшет заклеить пленкой и выдержать в течение 45-60 мин при температуре от +36 °С до +38 °С.

10.1.2. Промывание

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **трехкратно** промывочным буфером (см. п. 9.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая в лунках не менее 20 с.

10.1.3. Внесение специфического и контрольного антигенов

В лунки горизонтальных рядов З, Д, Н и Ч внести по 50 мкл соответствующие специфические антигены в рабочем разведении (см. п. 9.5., Рис. № 1).

Во все К-лунки планшета внести по 50 мкл контрольного антигена в рабочем разведении (см. п. 9.6., Рис. № 1).

10.1.4. Внесение конъюгатов

Конъюгаты вносят сразу вслед за антигенами без инкубации и удаления антигенов!

Во все З-лунки и ближайший ряд К-лунок планшета внести по 50 мкл рабочего разведения конъюгата Зика (п. 9.7.).

Во все Д-лунки и ближайший ряд К-лунок планшета внести по 50 мкл рабочего разведения конъюгата денге (п. 9.7.).

Во все Н-лунки и ближайший ряд К-лунок планшета внести по 50 мкл рабочего разведения конъюгата ЗН (п. 9.7.).

Во все Ч-лунки и ближайший ряд К-лунок планшета внести по 50 мкл рабочего разведения конъюгата Чикунгунья (п. 9.7.).

Планшет заклеить пленкой и выдержать в течение 60 мин при температуре от +36 °С до +38 °С.

10.1.5. Промывание

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **шестикратно** рабочим раствором № 1 (см. п. 9.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая в лунках не менее 20 с.

ВНИМАНИЕ! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов.

10.1.6. Внесение индикаторного раствора

В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п. 9.8.). Планшет поместить в защищенное от света место на 10 мин при температуре от +15 °С до +25 °С.

10.1.7. Остановка пероксидазной реакции

Во все лунки планшета внести по 100 мкл стоп-реактанта и немедленно провести учет результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Измерение оптической плотности (ОП) проводить при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения (620-650) нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

11.1. Результаты измерения, полученные на контрольных образцах должны удовлетворять требованиям, представленным в Таблице № 2:

Таблица № 2

Значение ОП в З-лунке с положительным контролем	не менее 0,60 не более 3,5
Значение ОП в Д-лунке с положительным контролем	не менее 0,60 не более 3,5
Значение ОП в Н-лунке с положительным контролем	не менее 0,60 не более 3,5
Значение ОП в Ч-лунке с положительным контролем	не менее 0,60 не более 3,5
Значение ОП в К-лунках с отрицательным контролем	не более 0,25

При получении иных показателей исследование повторить.

11.2. Исследуемый образец сыворотки считается **положительным в гомологичной системе** на IgM к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья если ОП исследуемого образца больше чем в 3 раза превышает ОП данного образца с нормальным антигеном (в К-лунке), но не менее 0,35.

Образец считается **сомнительным** - если ОП исследуемого образца находится в пределах 0,25-0,35 при ОП данного образца с нормальным антигеном (в К-лунке) не более 0,1.

В случае сомнительного результата рекомендуется исследовать образец, повторно взятый у того же пациента через неделю. Оценку результатов следует проводить на основании сравнения исследования парных сывороток от одного пациента на одном рабочем планшете. При повторном получении сомнительного результата при исследовании парных сывороток рекомендуется тестировать эти образцы другими методами.

Результат анализа рассматривается как ложноположительный, если ОП в К-лунке превышает 0,3. В этом случае образец необходимо исследовать повторно.

11.3. Выявление специфических IgM к вирусу Зика в сочетании с анализом эпиданамнеза и клинических проявлений является окончательным результатом при диагностике этой инфекции.

12. 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, в условиях нормальной влажности и отсутствия освещения. Замораживание не допускается. В случае нарушения условий транспортирования и хранения набор применению не подлежит.

При получении набора следует внимательно осмотреть упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения набор применению не подлежит.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в специализированных лабораториях, осуществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с возбудителями опасных инфекционных болезней.

Рекламации на качество набора необходимо направлять в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, тел. (499)193-30-50, (499)190-44-59, факс (499)190-66-71.

13. Срок годности

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

