

«СОГЛАСОВАНО»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ)



 И.А. Дятлов
2019 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)



 В.Г. Акимкин
2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® ИФА Zika virus-IgM



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

Разработано совместно с ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
(142279, Московская область, п. Оболensk, тел.: +7 (4967) 36-00-03, e-mail: info@obolensk.org)

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ПОВТОРЯЕМОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
СОСТАВ	16
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	17
А. Приготовление растворов	17
Б. Проведение иммуноферментного анализа	18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	21
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ИФА	- иммуноферментный анализ
K+	- положительный контроль
K-	- отрицательный контроль
КП	- коэффициент позитивности
ОП	- значение оптической плотности при 450 нм
РУ	- регистрационное удостоверение
ТМБ	- тетраметилбензидин, субстрат
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Anti-IgM	- антитела против IgM человека
IgM	- иммуноглобулины, антитела класса М
ZIKV	- <i>Zika virus</i> , вирус Зика

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ИФА *Zika virus*-IgM, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения специфических иммуноглобулинов класса М к антигенам вируса Зика в биологическом материале (сыворотке, плазме крови) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на заболевание, вызванное вирусом Зика, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление антител класса М к антигенам вируса Зика (ZIKV) включает следующие стадии:

На первой стадии в лунках иммуносорбента¹ проводят инкубацию биологических образцов. Специфические антитела, при наличии их в образце, связываются с антигенами на поверхности иммуносорбента.

На второй стадии проводят реакцию гибридизации образовавшегося иммунного комплекса антиген-антитело с рабочим раствором конъюгата, представляющим собой конъюгат антител козы к иммуноглобулинам человека класса М с пероксидазой хрена.

На третьей стадии после удаления несвязанных молекул конъюгата в лунки планшета добавляют раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом и последующее связывание продукта ферментативной реакции с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации IgM к антигенам ZIKV в образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора оценивают по оптической плотности при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620 – 650 нм).

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ИФА *Zika virus*-IgM»

Форма 1 рассчитана на проведение 96 серологических реакций, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Предел обнаружения

Набор реагентов выявляет антитела класса М к антигенам вируса Зика в разведении 1:2 при тестировании стандартного образца предприятия. Наличие антител к антигенам вируса Зика в стандартном образце предприятия подтверждено реакцией нейтрализации вируса Зика².

¹ Иммуносорбент ZIKV-IgM – 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованными в лунках рекомбинантными антигенами ZIKV.

² Руководство CDC «Updated Guidance for US Laboratories Testing for Zika Virus Infection. July 24, 2017». <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/laboratory-guidance-zika.pdf>.

Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of Zika virus: an update. Singh R.K. et al. *Front.Microbiol.* 2018. 8, 2677;

Холпер Дж., Макферсон Ян. и др. Методы вирусологии и молекулярной биологии: пер. с англ. Издательство «Мир», Москва, 1972.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет антитела класса М к антигенам вируса Зика при тестировании панели сывороток, содержащих IgM к антигенам *ZIKV*. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании образцов сыворотки и плазмы крови условно-здоровых доноров; образцов сыворотки крови, содержащих IgM к антигенам возбудителей, вызывающих образование высоко кросс-реактивных антител (*HSV 1*, *HSV 2*, *CMV*, *EBV*, *T.gondii*, *Rubella virus*, *HCV*, *HBV*). При тестировании вышеперечисленных образцов неспецифических взаимодействий выявлено не было.

Аналитическая специфичность при исследовании образцов сыворотки крови больных лихорадкой Западного Нила, лихорадкой денге, клещевым энцефалитом, в биологическом материале которых в ранние сроки заражения выявлена РНК возбудителя и сероконверсия антител IgM, составила: 93,7% для образцов сыворотки крови больных лихорадкой денге, 100% для образцов сыворотки крови больных лихорадкой Западного Нила, 100% для образцов сыворотки крови больных клещевым энцефалитом. Аналитическая специфичность при исследовании образцов сыворотки крови привитых от желтой лихорадки составила 100%.

В связи с высокой кросс-реактивностью антител образовавшихся в ответ на инфицирование (естественное или при вакцинации) человека различными флавивирусами, обусловленной наличием большого числа консервативных фрагментов в протеоме вирусов семейства *Flaviviridae*, при интерпретации результатов качественного выявления антител класса М к антигенам вируса Зика в биологическом материале с использованием набора реагентов АмплиСенс® ИФА *Zika virus-IgM* необходимо учитывать не только лабораторные, но и клинические и эпидемиологические данные.

Информация об интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Определение диагностической чувствительности проведено с использованием образцов сыворотки и плазмы крови больных лихорадкой Зика, вернувшихся из поездок в эндемичные страны. В биологическом материале больных (сыворотка крови, моча) методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью набора реагентов

«АмплиСенс® *Zika virus*-FL» (ПУ № РЗН 2016/4032) в ранние сроки заражения выявлена РНК возбудителя. Образцы сыворотки (всего 30 образцов) и плазмы (всего 30 образцов) крови таких пациентов собраны в период 5 – 20 дней после появления симптомов лихорадки Зика. В указанных образцах реакцией нейтрализации вируса исследовано наличие антител к антигенам вируса Зика (см. табл. 1) и проведено выявление IgM с использованием набора реагентов АмплиСенс® ИФА *Zika virus*-IgM и набора Anti-Zika Virus ELISA (IgM) (Euroimmun AG, Германия)³ (см.табл. 2).

Срок первого обнаружения IgM к антигенам вируса Зика – 5-ый – 7-ой день после появления симптомов. Минимальный срок циркуляции IgM – до 10-ого дня после появления симптомов, максимальный – до 90 дней после появления симптомов.

Определение диагностической специфичности проведено с использованием 30 образцов плазмы и 30 образцов сыворотки крови условно-здоровых доноров, которые предположительно никогда не контактировали и не имели прививок от флавивирусных инфекций (см. табл. 3).

Таблица 1

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ИФА *Zika virus*-IgM в сравнении с реакцией нейтрализации вируса Зика

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® ИФА <i>Zika virus</i> -IgM		Результаты реакции нейтрализации вируса Зика	
			положительных	отрицательных
Сыворотка больных лихорадкой Зика	Всего исследовано 30 образцов	положительных	29	1*
		отрицательных	0	0
Плазма больных лихорадкой Зика	Всего исследовано 30 образцов	положительных	29	1*
		отрицательных	0	0
Сыворотка	Всего	положительных	0	0

³ Набор реагентов Anti-Zika Virus ELISA (IgM) (Euroimmun AG, Германия) соответствует рекомендациям ВОЗ (Общий обзор разработки диагностических тестов на вирусную инфекцию Зика, Bull World Health Organ 2016;94:574–584D, doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.171207>; Протокол совещания ВОЗ по документальному подтверждению и требованиям к независимой оценке эффективности in vitro диагностикумов вируса Зика для включения их в перечень возможных к применению в чрезвычайных ситуациях, 24 March 2016, WHO, Женева, Швейцария http://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual-zika-virus/160324_eual_zika_meeting_march2016_outcomes.pdf?ua=1; Инструкции по требованиям к представлению: диагностикумы in vitro (IVDs) для выявления антител к вирусу Зика, оценка использования в чрезвычайных ситуациях и перечисление IVDs, PQDx_239 v4, WHO, Женева, Швейцария http://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual-zika-virus/161101_239_instructions_for_submission_requirements_ivds_detecting_zika.pdf?ua=1).

условно-здоровых доноров	исследовано 30 образцов	отрицательных	0	30
Плазма условно-здоровых доноров	Всего исследовано 30 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	30

* полученные дискордантные результаты объясняются тем, что на ранних этапах заболевания (5-ый – 7-ой дни после появления симптомов) не происходит образования нейтрализующих антител⁴

Таблица 2

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ИФА Zika virus-IgM и набора реагентов Anti-Zika Virus ELISA (IgM) (Euroimmun AG, Германия)

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® ИФА Zika virus-IgM		Результаты применения набора Anti-Zika Virus ELISA (IgM)	
			положительных	отрицательных
Сыворотка больных лихорадкой Зика	Всего исследовано 30 образцов	положительных	30	0
		отрицательных	0	0
Плазма больных лихорадкой Зика	Всего исследовано 30 образцов	положительных	30	0
		отрицательных	0	0
Сыворотка условно-здоровых доноров	Всего исследовано 30 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	30
Плазма условно-здоровых доноров	Всего исследовано 30 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	30

Таблица 3

Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ИФА Zika virus-IgM

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ⁵ (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале %	Диагностическая специфичность ⁶ (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %
Сыворотка	90,2-100%	90,5-100%
Плазма	90,2-100%	90,5-100%

⁴ Руководство ВОЗ «Laboratory testing for Zika virus infection. Interim guidance» World Health Organization 2016.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO_ZIKV_LAB_16.1_eng.pdf;jsessionid=407CDB3A4C1F5F92FF8BB6B4BB2FB366?sequence=1
⁵ Диагностическая чувствительность относительно использованного метода сравнения.
⁶ Диагностическая специфичность относительно использованного метода сравнения.

ПОВТОРЯЕМОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стандартное отклонение оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП) в ходе одного исследования не превышало 0,1. В ходе проведения исследования в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах, на идентичных объектах испытаний стандартное отклонение ОП не превышало 0,3. Данные результаты свидетельствуют о достаточной повторяемости и воспроизводимости независимых результатов испытаний.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей серологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»⁷, СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! Контроли K+ ZIKV-IgM инактивированный и K– ZIKV инактивированный содержат материалы человеческого происхождения.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28°C, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁸, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим

⁷ В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика серологическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции, или боксах микробиологической безопасности II класса.

⁸ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г кроме контролей K+ ZIKV-IgM инактивированный и K– ZIKV инактивированный. Контроли K+ ZIKV-IgM инактивированный и K– ZIKV инактивированный относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

- Обеззараживать отходы, образовавшиеся в процессе предварительной подготовки проб и проведения исследования, а также неиспользованный исследуемый материал, в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка гибридизации, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette с калия ЭДТА (K_2 ЭДТА) и гелем для плазмы (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
2. Вакуумная система забора крови типа Vacuette для сыворотки без антикоагулянта (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
3. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200, до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл или 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf).

Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

7. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
8. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°C.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
11. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

Проведение иммуноферментного анализа

12. Дистиллированная вода.
13. Мерный цилиндр на 100, 250 или 500 мл.
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
16. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 или 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
17. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
18. Одноразовые полипропиленовые или полистироловые пробирки на 5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл (например, Ахуген, США, или аналогичные).
20. Центрифужные пробирки на 15 и 50 мл с коническим дном (например, Corning («Корнинг»), США, или аналогичные).
21. Стаканы химические из термостойкого стекла объемом 100 мл (например, ПАО «Химлабприбор», Россия, или аналогичные).
22. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл, 2,0 мл и 5,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
24. Вортекс (например, SIA Biosan («Биосан»), Латвия, или аналогичный).

- 25.Термошейкер для планшетов (например, SIA Biosan («Биосан»), Латвия, или аналогичный).
- 26.Отсасыватель медицинский (например, ОМ-1, ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
- 27.Автоматический промыватель планшетов (например, Аквамарин, Biosan («Биосан»), Латвия, или аналогичный) – при промывании планшетов в автоматическом режиме.
- 28.Автоматический иммуноферментный анализатор для измерения оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620 – 650 нм) (например, Anthos 2010 («Антос 2010»), Biochrom Ltd (Биохром Лтд), Великобритания), с прилагаемым к нему программным обеспечением.
- 29.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
- 30.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
- 31.Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
- 32.Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма крови,
- сыворотка крови.

Плазма крови

Для получения образцов плазмы крови, взятие крови проводят утром натощак или через 3 часа после приема пищи в пробирку (специальную вакуумную систему) с калия ЭДТА (K_2EDTA) в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают и отстаивают в течение 6 ч при температуре от 2 до 8 °С. Затем пробирки с цельной кровью центрифугируют при 800-1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения серологического исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С в

течение 1 суток.

ВНИМАНИЕ! Образцы могут подвергаться замораживанию-оттаиванию не более двух раз.

Сыворотка крови

Для получения образцов сыворотки крови, взятие крови проводят утром натощак или через 3 часа после приема пищи в пробирку (специальную вакуумную систему) без антикоагулянта или с кремнеземом в качестве активатора свертывания. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Пробирки отстаивают при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) в течение 30 минут или в течение 6 ч при температуре от 2 до 8 °С до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800 – 1600 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Допускается хранение образцов сыворотки крови до проведения серологического исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается транспортирование сыворотки крови при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ВНИМАНИЕ! Образцы могут подвергаться замораживанию-оттаиванию не более двух раз.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Образцы плазмы и сыворотки крови не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Образцы плазмы и сыворотки крови нельзя подвергать термоинаktivированию.

Образцы отбирать и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст: каждый образец необходимо отбирать новым одноразовым наконечником.

Образцы с выраженным бактериальным проростом и содержанием триглицеридов более 12 ммоль/л могут дать неправильный результат.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (сыворотке, плазме крови), используемом для исследования. Для оценки влияния высоких концентраций эндогенных веществ были протестированы образцы плазмы крови, взятые в пробирки с калия ЭДТА (K₂ЭДТА) в качестве антикоагулянта, и образцы сыворотки крови, взятые в пробирки без антикоагулянта, без добавления потенциально интерферирующих веществ и с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, рекомендованных руководством EP7-A2 Института клинических и лабораторных стандартов⁹, и значительно превышающих верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ (см. табл. 4).

Таблица 4

Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
Общий билирубин	342 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
Общий холестерин	13 ммоль/л (верхняя граница нормы – 5,2 ммоль/л)	Не обнаружено
Триглицериды	от 12,0 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Обнаружено
Гемоглобин	2 г/л (верхняя граница нормы – 1 г/л)	Не обнаружено

Для оценки влияния экзогенных веществ (антикоагулянтов), были протестированы образцы цельной венозной крови, взятые в пробирки без антикоагулянта. В пробирки были немедленно добавлены растворы лития гепарина и калия ЭДТА (K₂ЭДТА) в качестве антикоагулянтов. Концентрация антикоагулянтов в образцах соответствовала диапазону, указанному в ГОСТ Р 53079.4-2008¹⁰ (см. табл. 5).

⁹ EP07-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition (2005). Clinical and Laboratory standards Institute – CLSI, USA. (Тестирование интерференции в клинической химии; Принятое Руководство-Второе издание (2005)).
¹⁰ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калий ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, литий гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

Таблица 5

Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
Калия ЭДТА (K ₂ ЭДТА)	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
Литий гепарин	от 12 МЕ/мл	Обнаружено

Состояние беременности не влияет на результаты качественного выявления антител класса М к антигенам вируса Зика в биологическом материале.

СОСТАВ

«ИФА *Zika virus-IgM*» – комплект реагентов для выявления антител класса М к антигенам вируса Зика в биологическом материале в формате иммуноферментного анализа. Комплект реагентов включает:

Компоненты	Описание	Объем, мл	Количество
Иммуносорбент <i>ZIKV-IgM</i>	Разборный 96-луночный плоскодонный планшет с иммобилизованными антигенами <i>ZIKV</i>	-	1 шт.
К+ <i>ZIKV-IgM</i> инактивированный	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от бесцветного до светло-желтого или желтого цвета	0,05	1 пробирка
К– <i>ZIKV</i> инактивированный	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от бесцветного до светло-желтого или желтого цвета	0,05	1 пробирка
Концентрат конъюгата <i>anti-IgM</i>	Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная вязкая жидкость	0,2	1 пробирка
Раствор для разведения (ИФА)	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от бесцветного до светло-желтого или желтого цвета	40	1 флакон
10х отмывочный раствор	Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость ¹¹	40	1 флакон
ТМБ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-желтого цвета	15	1 флакон
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
Планшет для предварительного разведения образцов	Цельный или разборный 96-луночный планшет	-	1 шт.
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из пластика для 8-ми канального дозатора	-	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеящаяся влагонепроницаемая пленка	-	2 шт.

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 серологических реакций, включая контроли.

¹¹ Допустимо образование кристаллического осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°C.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов. Перед использованием все компоненты набора следует выдержать 30 мин при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! После вскрытия индивидуальной упаковки Иммуносорбент ZIKV-IgM хранить в плотно закрытом пакете, не вынимая осушитель (силикагель), при температуре от 2 до 8 °С не более 8 недель.

ВНИМАНИЕ! После первого использования K+ ZIKV-IgM инактивированный, K– ZIKV инактивированный, Концентрат конъюгата anti-IgM, Раствор для разведения (ИФА) хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 8 недель.

А. Приготовление растворов

ВНИМАНИЕ! Все растворы необходимо отбирать одноразовыми наконечниками.

1. Приготовить в ванночках для разведения реагентов растворы для анализа требуемого количества 8-луночных стрипов в соответствии с табл. 6.
Примечание – При использовании автоматического промывателя планшетов приготовить рабочий отмывочный раствор, добавив к 40 мл 10х отмывочного раствора 360 мл дистиллированной воды.

Таблица 6

Объемы реагентов для проведения анализа

Количество 8-луночных стрипов, используемых для проведения анализа	Объем реагентов, используемых для приготовления, мл			
	Рабочего отмывочного раствора (при ручном режиме промывания)		Рабочего раствора конъюгата anti-IgM	
	10х отмывочный раствор	Дистиллированная вода	Концентрат конъюгата anti-IgM	Раствор для разведения (ИФА)
1	3,3	30	0,010	1
2	6,6	60	0,020	2
3	10	90	0,030	3
4	13,3	120	0,040	4
5	16,6	150	0,050	5
6	20	180	0,060	6
7	23,3	210	0,070	7
8	26,6	240	0,080	8
9	30	270	0,090	9
10	33,3	300	0,100	10
11	36,6	330	0,110	11
12	40	360	0,120	12

ВНИМАНИЕ! Рабочий раствор конъюгата anti-IgM следует готовить перед использованием за 10-20 мин до его внесения, хранить рабочий раствор конъюгата не более 1 часа при температуре от 18 до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Рабочий отмывочный раствор хранится не более 3 суток при температуре от 2 до 8 °С или 4 часа при температуре от 18 до 25 °С.

2. Приготовить **предварительное разведение исследуемых образцов**. Для этого в требуемое количество лунок планшета для предварительного разведения внести по **90 мкл раствора для разведения** и добавить по **10 мкл исследуемых образцов**. Перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! Разведенные исследуемые образцы подлежат использованию в течение одного часа после приготовления!

Б. Проведение иммуноферментного анализа

1. Вскрыть цефленовый пакет и извлечь **Иммуносорбент ZIKV-IgM**. Оставить в рамке-держателе необходимое число 8-луночных стрипов. Неиспользованные 8-луночные стрипы оставить в цефленовом пакете, при этом пакет следует плотно закрыть с помощью скрепки, предварительно завернув край пакета 2-3 раза. Осушитель (силикагель) из пакета не удалять!

ВНИМАНИЕ! Запрещается наносить на поверхность иммуносорбента какие-либо отметки.

2. Трижды промыть стрипы **рабочим отмывочным раствором**, внося его в лунки по **200 мкл** и выдерживая в лунках не менее 20 сек. Промывку проводить вручную, при помощи многоканальной пипетки, или с использованием автоматического промывателя планшетов.

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

3. В каждую лунку внести по **90 мкл раствора для разведения**. В лунки внести по **10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов** из планшета для предварительного разведения. В две любые свободные лунки внести по **10 мкл K+ ZIKV-IgM инактивированный**, в две другие – по **10 мкл K– ZIKV инактивированный**. Рамку-держатель закрыть пленкой или крышкой. Поместить в термошейкер для планшетов.
4. Инкубировать иммуносорбенты в термошейкере в течение 60 минут при температуре 37 °С и скорости вращения платформы 500 об/мин.

5. После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок с помощью вакуумного медицинского отсасывателя или с использованием автоматического промывателя планшетов.
6. Трижды промыть стрипы **рабочим отмывочным раствором**, внося его в лунки по **200 мкл** и выдерживая в лунках не менее 20 сек. Промывку проводить вручную, при помощи многоканальной пипетки, или с использованием автоматического промывателя планшетов.
7. В каждую лунку внести по **100 мкл рабочего раствора конъюгата anti-IgM**. Рамку-держатель закрыть пленкой или крышкой. Поместить в термошейкер для планшетов.
8. Инкубировать иммуносорбенты в термошейкере в течение 60 минут при температуре 37 °С и скорости вращения платформы 500 об/мин.
9. После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок с помощью вакуумного медицинского отсасывателя или с использованием автоматического промывателя планшетов.
10. Четырежды промыть стрипы **рабочим отмывочным раствором**, внося его в лунки по **200 мкл** и выдерживая в лунках не менее 20 сек. Промывку проводить вручную, при помощи многоканальной пипетки, или с использованием автоматического промывателя планшетов.
11. В каждую лунку внести по **100 мкл ТМБ**. Рамку-держатель поместить в защищенное от света место на 5 – 7 мин при температуре от 18 до 25 °С.
12. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по **50 мкл стоп-реагента**.
13. В течение 3-5 минут провести измерение оптической плотности.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Провести измерение оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения 620 – 650 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

Результат исследования считается **достоверным***, если:

- а) среднее значение ОП в лунках с К– ZIKV инактивированный менее порогового значения, указанного во вкладыше к набору реагентов.
- б) среднее значение ОП в лунках с К+ ZIKV-IgM инактивированный превышает пороговое значение, указанное во вкладыше к набору реагентов.

* В случае получения **недостоверного** результата необходимо провести

повторное исследование всех образцов.

2. Рассчитать значение «**cut off**» по формуле:

$$\text{cut off} = \text{КП} * \text{ОП(К– ZIKV)}_{\text{ср}}, \text{ где}$$

КП – коэффициент позитивности, указанный во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов,

ОП(К– ZIKV)_{ср} – среднее значение оптической плотности двух повторов отрицательного контроля К– ZIKV.

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Образец считают **отрицательным** на наличие антител IgM к антигенам вируса Зика, если в соответствующей ему лунке получено $\text{ОП} \leq 0,9 * \text{cut off}$.

Образец считают **положительным** на наличие антител IgM к антигенам вируса Зика, если в соответствующей ему лунке получено $\text{ОП} \geq 1,1 * \text{cut off}$.

Образец считают **сомнительным** на наличие антител IgM к антигенам вируса Зика, если в соответствующей ему лунке получено $0,9 * \text{cut off} < \text{ОП} < 1,1 * \text{cut off}$.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Срок годности планшета для предварительного разведения образцов, ванночки для разведения реагентов и пленки для заклеивания планшета соответствует сроку годности набора реагентов.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплект реагентов «ИФА *Zika virus*-IgM» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8°С. Иммуносорбент *ZIKV*-IgM хранить в пакетах с влагопоглотителем, ТМБ хранить в защищенном от света месте. Планшет для предварительного разведения образцов, ванночка для разведения реагентов и пленка для заклеивания планшета не требуют специальных условий хранения.

Холодильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹².

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В.Ржевская

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Беречь от влаги
	Изготовитель		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		

печатью _____ листа _____

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.Г. АКИМКИН





Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов
для диагностики in vitro
АмплиСенс® ИФА Zika virus-IgM

ВЕРНО

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Форма 1 **REF** Н-3551-10

В.Г. Акимкин

« 16 » 04 2019 г.



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



Разработано совместно с ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
(142279, Московская область, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-03, e-mail: info@obolensk.org)

VER 15.04.19

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Подготовку исследуемого материала, приготовление растворов, анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Действие	Описание	
Промыть 3 раза	Рабочий отмывочный раствор, 200 мкл, выдержать 20 сек	
Внести	90 мкл	Раствор для разведения в каждую лунку
	10 мкл	Предварительно разведенные исследуемые образцы в лунки для исследуемых образцов
	10 мкл	K+ ZIKV-IgM инактивированный в две лунки
	10 мкл	K- ZIKV инактивированный в две лунки
Инкубировать	60 мин, 37 °С, 500 об/мин	
Промыть 3 раза	Рабочий отмывочный раствор, 200 мкл, выдержать 20 сек	
Внести	100 мкл	Рабочий раствор конъюгата anti-IgM
Инкубировать	60 мин, 37 °С, 500 об/мин	
Промыть 4 раза	Рабочий отмывочный раствор, 200 мкл, выдержать 20 сек	
Внести	100 мкл	ТМБ
Инкубировать	5 – 7 мин, 18 – 25 °С, в темноте	
Внести	50 мкл	Стоп-реагент
Измерить	ОП при 450 нм (длина волны сравнения 620 – 650 нм)	