

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Министра здравоохранения

Республики Беларусь

Б.Н. Андросюк

«04» 2020 г.



УТВЕРЖДАЮ

Директор РНПЦ эпидемиологии и

микробиологии

В.А. Горбунов

2020 г.



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СУММАРНЫХ АНТИТЕЛ К КОРОНАВИРУСУ
SARS-CoV-2 МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
«SARS-CoV-2-РекИФА-АТ»**

(ТУ BY 100558032.422 – 20)

Инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО

Главный врач УЗ «Минская областная
клиническая больница»

А. А. Линкевич

2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Главный врач УЗ «10-я городская
клиническая больница»

В. П. Исачкин

2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора

Центра экспертиз и испытаний в

здравоохранении

М.И. Злотникова

2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Главный врач УЗ «Городская
инфекционная клиническая больница»
г. Минска

Н. Н. Юровский

2020 г.



Основой набора реагентов для выявления суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2 (далее набор) является рекомбинантный вирусспецифический белок. Основным свойством набора является его способность выявлять суммарные антитела (IgA, IgM, IgG) к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке/плазме крови пациентов за счет их взаимодействия с иммобилизованным на лунках планшета рекомбинантным белком. Образованный комплекс антиген-антитело выявляется с помощью иммуопероксидазного конъюгата.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке/плазме крови пациентов. Набор рассчитан на проведение 96 исследований в четырех постановках (96/4)

2. СОСТАВ НАБОРА

- Планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным коронавирусом SARS-CoV-2-специфическим белком		1 шт.
- ПК - сыворотка крови человека, содержащая суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2	№1	4 фл.
- ОК - сыворотка крови человека, не содержащая антител к коронавирусу SARS-CoV-2	№2	4 фл.
- Конъюгат пероксидазный*	№3	1 фл.
- РР О/К - раствор для разведения образцов / конъюгата	№4	2 фл.
- ФСТБ - фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор (концентрат (x26), допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°C)	№5	2 фл.
- ТМБ - тетраметилбензидин (субстратный раствор)	№6	1 фл.
- Стоп-реагент – раствор серной кислоты	№7	1 фл.
- Пакет полиэтиленовый с защелкой		1 шт.
- Планшет для предварительного разведения образцов		1 шт.
- Инструкция по применению		1 шт.

*хранить при температуре от минус 16°C до минус 20°C

3. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

– Все манипуляции с биологическим материалом пациентов осуществляют в соответствии с требованиями безопасности при работе с ПБА 2 группы риска (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки» от 06.01.2017 г.).

– Персонал, проводящий исследования, должен использовать средства индивидуальной защиты, рекомендованные при работе с биологическим материалом, зараженным/подозрительным на заражение коронавирусом SARS-CoV-2.

– Сыворотка/плазма крови человека, используемая для приготовления контролей, инактивирована нагреванием, проверена и считается не содержащей HBsAg, антигена p24 ВИЧ-1, антител к SARS-CoV-2 (кроме положительного контроля), ВИЧ 1/2 и гепатита С.

– Стоп-реагент содержит серную кислоту - не допускать попадания на кожу и слизистые.

4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ

- термостат, поддерживающий температуру (37±1)°C (любой марки);
- спектрофотометр, 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°C и от минус 16 до минус 20°C (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, 50,0 мл, 500,0 мл;
- пробирки типа «Эшендорф» на 1,5 мл;
- штативы для пробирок (любой марки);
- вода дистиллированная или деионизированная;
- спирт этиловый, 70%;
- вата медицинская гигроскопическая;
- перчатки медицинские одноразовые;
- дезинфицирующие средства;
- фильтровальная бумага;

- ванночки для реагентов;
- контейнер для потенциально инфекционных отходов.

5. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Взятие биологического материала

Исследуемый материал – сыворотка или плазма крови без признаков выраженного гемолиза, или хилеза. Кровь пациентов отбирают не ранее 10 суток от начала заболевания.

Сыворотку получают путем взятия не менее 1,0 мл крови в специальные пробирки без антикоагулянтов, или с активаторами свертывания крови, в том числе с разделяющим гелем. Для получения плазмы кровь берут в пробирки с антикоагулянтами (ЭДТА, гепарин, цитрат натрия). Сыворотку/плазму крови получают стандартным методом. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

Хранят образцы до анализа не более 5 дней при температуре от 2 до 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 образцы сывороток, которые замораживались/оттаивались более трех раз. При размораживании образцов плазмы для предупреждения осаждения фибрина образцы быстро размораживают при +(38-40)°С. Размороженные образцы после оттаивания обязательно тщательно перемешивают.

5.2 Подготовка реагентов.

А) Реагенты, готовые к применению:

- Планшет разборный с иммобилизованным коронавирусом SARS-CoV-2-специфическим рекомбинантным белком SC2N

- ТМБ

- Стоп-реагент

Б) Реагенты, требующие предварительного разведения:

- Приготовление рабочего промывочного раствора. Перед приготовлением рабочего промывочного раствора содержимое флакона с концентратом ФСТБ (№5) тщательно перемешивают. Необходимый объем концентрата разводят в 26 раз соответствующим объемом дистиллированной воды (см. табл. 1) и тщательно перемешивают.

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, концентрат (x26), мл – фл. №5	3	6	10	12	15	20	21	24	30	31	33	40
Количество дистиллированной воды, мл	75	150	250	300	375	500	525	600	750	775	825	1000

- Приготовление контрольных образцов: ПК (№1) растворяют в 0,3 мл РР О/К (№4), визуально контролируют полноту растворения; ОК (№2) растворяют в 0,4 мл РР О/К (№4), визуально контролируют полноту растворения.

- Приготовление разведений исследуемых образцов. Образцы исследуют в разведении 1:100 на растворе для разведения образцов/конъюгата. Готовят разведения любым из 2-х способов

Способ 1. В пробирку типа эппендорф вносят 495 мкл раствора РРО/К (№4) + 5 мкл исследуемого образца, тщательно пипетируют, получают разведение 1:100.

Способ 2. Последовательное разведение исследуемых образцов с использованием планшета для их предварительного разведения. Шаг №1 - в лунки планшета для предварительного разведения (количество используемых лунок планшета должно соответствовать количеству исследуемых образцов) вносят по 90 мкл раствора РР О/К (№4) и по 10 мкл исследуемого образца. Получают промежуточное разведение – 1: 10. Шаг №2, во время которого получают разведение исследуемого образца 1: 100, осуществляют непосредственно при постановке ИФА в лунках планшета с иммобилизованным рекомбинантным белком (см. п.5.3.3) .

- Приготовление рабочего раствора конъюгата. Готовят перед использованием. Перед приготовлением содержимое флакона №3 тщательно перемешивают пипетированием. Затем, в зависимости от количества используемых стрипов (см. табл. 2), в чистый флакон вносят необходимый объем РР О/К (№4) и соответствующий объем конъюгата пероксидазного (№3). 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 конъюгата пероксидазного (№3), мл	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200	0,225	0,250	0,275	0,300
Количество РР О/К (№4), 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

5.3 Постановка иммуноферментного анализа (ИФА)

5.3.1 Непосредственно перед постановкой ИФА все используемые реагенты и образцы биологического материала, за исключением конъюгата, выдерживают 15-30 минут при комнатной температуре.

5.3.2 Планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным вирусспецифическим белком извлекают из пакета. Отбирают необходимое для исследования проб количество стрипов, учитывая, что ПК вносится в 2 лунки планшета, ОК – в 3 лунки, каждый из образцов сывороток - в 1 лунку планшета. Остальные стрипы вновь помещают в пакет из фольги, плотно закрывают, хранят при температуре от 2 до 8°С и используют в течение 3-х месяцев после вскрытия.

5.3.3 ПК, ОК вносят в лунки планшета в объеме 0,1 мл. При использовании для разведения сывороток способа № 1 каждый из исследуемых образцов вносят в 1 лунку планшета в объеме 0,1 мл.

При подготовке образцов сывороток крови **способом № 2** осуществляют шаг № 2. После внесения ПК и ОК в остальные лунки планшета вносят по 90 мкл РР О/К (№4). Затем каждую из сывороток, предварительно разведенных в 1:10 раз (см. шаг № 1), в объеме по 10 мкл вносят в соответствующие лунки планшета и тщательно пипетируют - получают конечное разведение исследуемых сывороток 1:100.

Планшет помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 1,0 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.3.4 Промывают планшет 4 раза рабочим промывочным раствором. Для этого предварительно удаляют содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором. Затем в каждую лунку вносят не менее 0,38 мл рабочего промывочного раствора, удаляют содержимое и повторяют эту процедуру еще 3 раза.

5.3.5 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата. Инкубируют 40 мин при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Промывают 8 раз рабочим промывочным раствором (см. п. 5.3.4).

5.3.6 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл ТМБ (№6)

5.3.7 Планшет выдерживают в течение 5 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.

5.3.8 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл стоп-реагента (№7) для остановки цветной реакции.

5.4 Учет и интерпретация результатов

Через 2-3 мин после внесения стоп-реагента проводят спектрофотометрию проб: длина волны измерения - 450 нм, фоновая - 620 нм.

Проведение анализа считается достоверным при соблюдении следующих условий:

- рассчитывается среднее значение показателя оптической плотности (ПОП) для ОК – ПОП ОК ср.
- ПОП ОК ср. не должен превышать 0,25 оптической единицы.
- ПОП ПК должен превышать ПОП ОК ср. не менее чем в 3 раза.
- рассчитывается 2 критических показателя оптической плотности - ПОПкр.1 и ПОПкр.2:

$$\text{ПОПкр.1} = \text{ПОП ОК ср.} \times 2,8$$

$$\text{ПОПкр.2} = \text{ПОП ОК ср.} \times 3$$

Результат считают **отрицательным**, если ПОП в лунках с исследуемым образцом (ПОП *иссл.*) $\leq$ ПОПкр. 1

Результат считают **положительным**, если ПОП *иссл.* $\geq$ ПОПкр. 2

Результат считают **неопределенным**, если ПОПкр. 1 < ПОП *иссл.* < ПОПкр. 2.

При получении сомнительного результата проводят повторное исследование образца, взятого через 7-10 дней, если при повторном исследовании получают сомнительный результат, образец считают отрицательным.

Схема учета и интерпретации результатов

ПОП	Результата
ПОП <i>иссл.</i> $\leq$ ПОПкр. 1	Отрицательный , образец оценивается как не содержащий суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2
ПОП <i>иссл.</i> $\geq$ ПОПкр. 2	Положительный , образец оценивается как содержащий суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2
ПОПкр. 1 < ПОП <i>иссл.</i> < ПОПкр. 2	Неопределенный (серая зона) Повторное исследование через 7-10 дней. При повторном получении неопределенного результата образец считают отрицательным.

Для полуколичественной оценки полученных результатов рассчитывают коэффициент позитивности (КП). КП рассчитывается только для положительных проб.

$$\text{КП} = \text{ПОП исследуемого образца} / \text{ПОПкр.2}$$

КРАТКАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИФА «SARS-CoV-2-РекИФА-АТ»

Прежде, чем пользоваться данной схемой, необходимо внимательно ознакомиться со всей инструкцией к набору.

Наименование операции	Время и температура инкубации
100 мкл ПК – 2 лунки 100 мкл ОК – 3 лунки 100 мкл исследуемых образцов в разведении 1:100 (495 мкл РР О/К (№4) + 5 мкл исследуемого образца)	1 ч при 37°С
Промыть 4 раза	

100 мкл рабочего раствора конъюгата	40 мин при 37°C
Промыть 8 раз	
100 мкл ТМБ	5 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте
100 мкл стоп-реагента	
Провести спектрофотометрию проб: длина волны измерения - 450 нм, фоновая - 620 нм.	

6. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Сероконверсия в отношении суммарных антител к SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 начинает регистрироваться, как правило, на 7 – 10 сутки с момента появления клинических симптомов, количество антител достигает максимума на 28-49 сутки. В связи с этим возможно получение ложноотрицательных результатов при исследовании проб, взятых в серонегативный период (до 10-14 суток с момента появления клинических симптомов). Ложноотрицательный результат может быть получен также вследствие индивидуальных особенностей иммунного ответа, у пациентов с иммунодефицитами.

Для установления диагноза COVID-19 результаты серологического теста необходимо учитывать в комплексе с другими данными, включающих результаты ПЦР и клинической диагностики.

7. КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

7.1 Чувствительность

Чувствительность набора составила 100% при тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток, содержащих суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2 (20 проб).

При тестировании 290 образцов сывороток пациентов с диагнозом COVID-19, проходящих лечение в городской клинической инфекционной больнице г. Минска, суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2 были выявлены у 100% пациентов.

При тестировании сывороток, взятых в разные сроки от момента появления клинических симптомов, у 32 пациентов, проходящих лечение в городской клинической инфекционной больнице г. Минска, суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2 были выявлены

- спустя менее 8 сут. от момента появления клинических симптомов – у 18,75% пациентов,
- на 8-10 сут. – у 40% пациентов,
- на 11-14 сут. – у 62,5% пациентов,
- спустя более 14 сут. – у 100% пациентов.

7.2 Специфичность

Специфичность набора при тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток, не содержащих суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2 (20 проб), составила 100%.

При тестировании с использованием набора 50 образцов сывороток здоровых доноров, полученных до пандемии (январь-август 2019 г.), для всех исследуемых сывороток был получен отрицательный результат.

В исследованиях сывороток крови, содержащих антитела к другим респираторным вирусам, в том числе – коронавирусу человека NL63/229E, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна-Барр, ВГЧ 6, энтеровирусам, с использованием набора был получен отрицательный результат.

7.3 Воспроизводимость

При повторном тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток наборами из одной серии и из разных серий воспроизводимость значений КП составляла не менее 95%.

8. СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 12 месяцев с даты изготовления.

Хранение набора осуществляют при температуре от 2 до 8°C в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности за исключением реагента №3, который хранится при температуре от минус 16°C до минус 20°C. Транспортирование набора осуществляют при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов. При получении набор необходимо разукрупнять и хранить в соответствии с вышеуказанными температурами.

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ ВУ 100558032.422-2020 при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.