ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения содержания иммуноглобулинов класса G к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

«ИФА-IgG-SARS-CoV-2»

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор предназначен для выявления специфических IgG к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека с целью диагностики COVID-19, оценки наличия постинфекционного или поствакцинального иммунитета против коронавирусной инфекции (КВИ).

Набор предназначен для применения только in vitro.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

Компонент набора	Количество
Иммуносорбент (*разборный планшет с иммобилизованным рекомбинантным антигеном вируса SARS-CoV-2*)	1 шт.
Конъюгат (*антивидовые АТ к IgG человека, конъюгированные пероксидазой хрена*)	11 мл
Положительный контроль (*К+*)	0,5 мл
Отрицательный контроль (*К-*)	1,0 мл
Раствор для разведения сывороток (*РРС*)	100 мл
20-ти кратный концентрат промывочного раствора*	20 мл
ТМБ-субстрат*	12 мл
Стоп-реагент* (*содержит серную кислоту, 0,5М*)	12 мл

*Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера серии в наборах реагентов производства ООО «Альгимед Техно».

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая чувствительность выявления IgG к SARS-CoV-2, определенная при исследовании 100 образцов сыворотки и плазмы крови больных с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2, составила: 92,0% (85,3% - 92,0% с доверительной вероятностью 95%).

3.2 Диагностическая специфичность выявления IgG к SARS-CoV-2, определенная на выборке отрицательных образцов сыворотки и плазмы, полученных от 150 пациентов, составила: 100% (95,5% - 100% с доверительной вероятностью 95%).

3.3 Для оценки аналитической специфичности использовали 92 образца сыворотки крови пациентов, содержащие специфические IgG к: эндемическому коронавирусу человека NL63, вирусу H1N1, респираторно-синтициальному вирусу, вирусу ветряной оспы, вирусу эпидемического паротита, вирусу кори, вирусу гриппа, ротавирусу, аденовирусу, энтеровирусу. Перекрестно-положительных образцов обнаружено не было.

4. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Принцип работы набора основан на непрямом неконкурентном ИФА-анализе. Исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках планшета, покрытых рекомбинантным нуклеокапсидным белком. Если в пробе присутствуют иммуноглобулины к данному белку, они специфически свяжутся с белком, иммобилизированным в лунках планшета. На следующем этапе антитела класса IgG, выявляют при помощи вторых антител в составе пероксидазного конъюгата. После проведения инкубации с субстратом и внесения стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора. Измеренная оптическая плотность находится в прямой зависимости от количества иммуноглобулинов G в контрольных и исследуемых образцах.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 При работе с набором следует надевать спецодежду (халаты) и одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5.2 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [2].

5.3 Рекомбинантный нуклеокапсидный белок, содержащийся в наборе «ИФА-IgG-SARS-CoV-2» является биологически безопасным. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

5.4 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

6. ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

6.1 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- строгое выполнение всех требований данной инструкции;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов на всех стадиях анализа;
- каждый образец сыворотки (плазмы) крови человека, а также реагенты набора необходимо отбирать новым одноразовым наконечником;

- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность;
- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать дезинфицирующими средствами (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);
- дозирующие устройства, применяемые в лаборатории должны регулярно проходить метрологический контроль;
- при внесении реагентов в лунки микропланшета необходимо осуществлять постоянный визуальный контроль за уровнем жидкости;
- при работе с набором в лаборатории температура окружающего воздуха должна быть от + 18 °С до + 25 °С.

7. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

7.1 Оборудование и материалы

- Автоматический микропланшетный спектрофотометр (ридер) со светофильтрами 450 нм, 620-650 нм;
- Пробирки для разведения образцов (объемом 2-4 мл);
- Дозаторы на 10, 100 и 1000 мкл;
- Одноразовые наконечники и ванночки.

Опционально:

- Инкубатор для микропланшетов;
- Устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое (вошер).

8. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы сывороток (плазмы) крови человека необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы) крови человека, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток (плазмы) крови человека хранят при температуре (2-8) °С в течение 48 ч. Допускается однократное замораживание образцов сывороток (плазмы) крови человека (желательно до температуры ниже минус 20 °С). Образцы сыворотки (плазмы) крови человека с выраженным гемолизом, хилезом, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригодны для анализа.

- ✓ Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят от +18 до +25°С, выдерживая его при комнатной температуре.
- ✓ Образцы тщательно перемешивают.
- ✓ При наличии видимых взвешенных частиц, образец осветляют центрифугированием.

8.1 Подготовка образцов

- Пробирки для разведения образцов маркируют согласно исследуемым пробам сыворотки или плазмы крови.
- В пробирки вносят по 990 мкл раствора для разведения образцов.
- Затем в каждую пробирку вносят по 10 мкл исследуемой сыворотки или плазмы.
- Образцы тщательно перемешивают.
- Образцы необходимо разводить непосредственно перед анализом, хранению они не подлежат.

9. ПОДГОТОВКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

9.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре (18-25°С) не менее 30 минут.

Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении измерений.

Реагенты, готовые к использованию: иммуносорбент, конъюгат, $К^+$, $К^-$, РРС, ТМБ-субстрат, стоп-реагент.

9.2 Подготовка микропланшета

Микропланшет со стрипами вынимают из упаковки. В рамку микропланшета помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок. Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят при температуре 2 – 8°С.

9.3 Подготовка реагентов для ИФА анализа

9.3.1 Приготовление промывочного раствора

Аликвоту 20-ти кратного концентрата промывочного раствора, рассчитанную в соответствии с количеством используемых стрипов, отмеряют мерным цилиндром и переносят в коническую колбу, приливают дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты концентрата, и перемешивают. Полученный раствор хранят при температуре от +2 °С до +8 °С не более 1 месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1 Заполнить карту серодиагностики с указанием размещения контролей и анализируемых проб в соответствующих лунках планшета.

10.2 Приготовить рабочее разведение исследуемых образцов (согласно п.8.1).

10.3 Внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца в 3 лунки, 100 мкл положительного контроля в 1 лунку, в остальные лунки по 100 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов.

10.4 Инкубировать планшет при температуре от + 18 °С до + 25 °С в течение 30 мин.

10.5 Трижды промыть лунки планшета, добавляя при этом в лунки по 350 мкл промывочного раствора. Выполнить следующий этап сразу после промывания планшета. Не допускать высыхания планшета на воздухе в перерывах между этапами работы.

10.6 Внести по 100 мкл конъюгата во все лунки.

10.7 Инкубировать планшет при температуре от + 18 °С до + 25 °С в течение 30 мин.

10.8 Промыть лунки микропланшета в соответствии с п. 10.5.

10.9 Внести по 100 мкл ТМВ-субстрата. Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки ТМБ-субстрата во избежание его контаминации.

10.10 Микропланшет инкубируют в защищенном от света месте в течение 15 мин.

10.11 Сразу же после окончания времени инкубации внести по 100 мкл стоп-реагента и аккуратными круговыми движениями планшета перемешать содержимое лунок.

10.12 Измерить оптическую плотность раствора в лунках с помощью автоматического фотометра в одноволновом (при длине волны 450 нм) или двухволновом (при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм).

11. ОЦЕНКА ПРАВИЛЬНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты исследуемых проб можно учитывать при соблюдении следующих условий:

- Среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного контроля **не должно превышать 0,25**.
- Оптическая плотность положительного контроля должна быть **не менее 0,6.**

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Найти среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного контроля ($\bar{x}$).
- Рассчитать пороговые значения используя следующие формулы:
  - Пороговое значение положительного результата $= 1{,}1 \times (\bar{x} + 0{,}18)$
  - Пороговое значение отрицательного результата $= 0{,}9 \times (\bar{x} + 0{,}18)$
- Используя полученные значения оценить результаты анализа.
  - Проба считается **положительной**, если ее ОП **больше** порогового значения положительного результата ($1{,}1 \times (\bar{x} + 0{,}18)$);
  - Проба считается **отрицательной**, если ее ОП **меньше** порогового значения отрицательного результата ($0{,}9 \times (\bar{x} + 0{,}18)$);
  - Результат считается **сомнительным**, если ОП образца **находится в диапазоне между** пороговыми значениями положительного ($1{,}1 \times (\bar{x} + 0{,}18)$) и отрицательного результата ($0{,}9 \times (\bar{x} + 0{,}18)$) («серая зона»).. В этом случае рекомендуется повторить исследование сыворотки крови в двух лунках. Если результат снова будет сомнительным, рекомендуется повторить анализ через 10-14 дней.
- Рассчитать коэффициент позитивности (КП) по следующей формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП}}{(\bar{x} + 0{,}18)},$$

где ОП – оптическая плотность исследуемого образца.

  - Проба считается **положительной**, если КП больше **1,1**;
  - Проба считается **отрицательной**, если КП меньше **0,9**;
  - Результат считается **сомнительным**, если КП образца находится в диапазоне между **0,9** и **1,1** («серая зона»). В этом случае рекомендуется повторить исследование сыворотки крови в двух лунках. Если результат снова будет сомнительным, рекомендуется повторить анализ через 10-14 дней.

13. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

13.1 Набор предназначен для качественного определения наличия IgG к SARS-CoV-2. Результаты данного теста не должны использоваться в качестве единственной основы для клинической диагностики и назначения лечения. Подтверждение наличия антител к новому вирусу SARS-CoV-2 должно основываться на совокупности результатов других тестов в сочетании с клинической картиной заболевания конкретного пациента.

13.2 На начальном этапе инфицирования вирусом SARS-CoV-2 (серонегативный период) результаты анализа на IgG могут быть отрицательными. Анализы пациентов со слабым иммунитетом или с сопутствующими заболеваниями, влияющими на иммунную систему, при отсутствии органов иммунной системы, а также при приеме лекарств для искусственного угнетения иммунитета могут также быть отрицательными даже при наличии инфекции. Если пациент ранее перенес заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV или другими вирусами семейства *Coronaviridae*, его анализ может быть ложноположительным ввиду схожести различных вирусов данного семейства.

13.3 Бактериальное или грибковое загрязнение образца сыворотки или реагентов, или перекрестное загрязнение реагентов может привести к ошибочным результатам.

14. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

14.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8)°С.

14.2 Хранение набора должно производиться при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности.

14.3 Срок годности набора - 12 месяцев.

Изготовитель:
ООО «Альгимед Техно»
220090, г Минск, Логойский тракт 22/1, ком.309
Тел. + 375 (29) 893-14-44
techno@algimed.com

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

БИБЛИОГРАФИЯ

[1] 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 06.01.2017г.

[2] Приказ №165 МЗ РБ от 25.11.2002 г.
О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения

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