АО «Вектор-Бест»

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к SARS-CoV-2

(SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного определения иммуноглобулинов класса М (IgM) к SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа. Набор можно использовать при диагностике COVID-19.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном capture - варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии анализа происходит связывание содержащихся в анализируемом образце IgM с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека. На второй стадии связавшиеся IgM к SARS-CoV-2 взаимодействуют с конъюгатом рекомбинантного антигена SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена. При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся иммунные комплексы. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к SARS-CoV-2 в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности в лунках планшета.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание.*	**Кол-во**
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека	1 шт.
Положительный контрольный образец ($К^+$) *Содержит IgM к SARS-CoV-2.* *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	1 фл., 1,5 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$)	1 фл.,

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

Не содержит IgM к SARS-CoV-2. *Содержит ProClin 300 (0,03 %).*	2,5 мл
Конъюгат *Конъюгат рекомбинантного антигена SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена.* *Содержит натрия мертиолят (0,0008%), ProClin 150 (0,004 %), ProClin 300 (0,027 %), фенол (0,004 %).*	1 фл., 13,0 мл
Раствор для разведения сывороток (РРС)	1 фл., 12,0 мл
Раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) *Содержит ProClin 300 (0,02 %).*	1 фл., 10,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25 %).*	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) *Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,025 %).*	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9 %).*	1 фл., 12,0 мл
Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
Плёнки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая чувствительность выявления IgM к SARS-CoV-2: клинические испытания, проведенные на положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 75 пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 95,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.2. Диагностическая специфичность выявления IgM к SARS-CoV-2: клинические испытания, проведенные на отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 254 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.3. Для оценки аналитической специфичности (перекрестной реактивности) использовали 229 образцов сыворотки крови от пациентов с ревматоидным фактором класса М, от беременных женщин и пациентов с другими гетерологичными заболеваниями в острой стадии, содержащими специфические IgM: грипп типа А и В, аденовирусная инфекция, риновирусная инфекция; коронавирусная инфекция, вызванная HCoV-229E, SARS-CoV и MERS-CoV; инфекция, вызванная вирусом Varicella Zoster, цитомегаловирусом, вирусом кори, вирусом Rubella, вирусом простого герпеса первого типа, вирусом Эпштейна-Барр; бактериальная пневмония и бронхит, вызванные Mycoplasma pneumoniae и Chlamydophila pneumonia; HBV-инфекция, HCV-инфекция, HIV-1,2-инфекция; инфекция, вызванная Mycobacterium tuberculosis. Перекрестно реагирующих образцов обнаружено не было.

Образцы сыворотки (плазмы) от пациентов, инфицированных вирусом HCoV-NL63, HCoV-OC43 и HCoV-HKU1 не тестировались!

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

3.4. Воспроизводимость результатов: клинические испытания, проведенные на 175 положительных и 304 отрицательных образцах с использованием двух серий набора реагентов, показали 100 % межсерийную воспроизводимость результатов. Результаты ИФА показали хорошую воспроизводимость набора (коэффициент вариации ОП не более 8 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. SARS-CoV-2 (ранее 2019-nCoV) - новый вид коронавирусов, вызывающий опасное инфекционное заболевание COVID-19, относится к II группе патогенности.

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению IgM к SARS-CoV-2, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, натрия мертиолят, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2 «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с иссле-

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

дуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны - 450 нм (например, Анализатор иммуноферментный микропланшетный автоматический Infinite F50, «Текан Австрия ГмбХ», РУ № ФСЗ 2010/07029 или Анализатор иммуноферментных реакций АИФР-01 УНИПЛАН, ЗАО «ПИКОН», РУ № ФСР 2010/08123);

– термостатируемый шейкер орбитального типа, поддерживающий температуру (37±1) °С, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 10 до 5000 мкл;

– дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профиль-

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

ной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека или образцы плазмы крови, полученной с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА или цитрата натрия.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки или плазмы крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

6.5. Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 10 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 20 мг/мл пригодны для использования.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26) °С не менее 30 мин.

- При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-регента при температуре (2-30) °С.

- Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

- Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

- Для приготовления растворов и проведения ИФА использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

- При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания

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

системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% этиловом спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

- В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом, а затем дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

- Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

- Запрещается повторное использование планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей необходимо прогреть его при температуре (30–40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2-8) ºС не более 1 месяца или при (18-26) ºС не более 7 суток.

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Раствор ТМБ.

Раствор ТМБ готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ в ванночку для реагента.

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

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы развести в 10 раз РПРС. Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельных образцов сыворотки (плазмы), тщательно перемешать.

При разведении сыворотки красный цвет РПРС должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

10-ти кратно разведенные образцы можно хранить не более 3 ч при температуре (18-26) °С.

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Контрольные образцы ($К^+$ и $К^-$) и стоп-реагент готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В любые две лунки, например, А-1 и В-1, внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^–$), в одну лунку, например, С-1 – 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.6.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 30 мин в термостатируемом шейкере при температуре (37±1) °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

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

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 30 мин в термостатируемом шейкере при температуре (37±1) °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом).***

8.4. По окончании второй инкубации промыть лунки, как указано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (см. п. 7.5.) и инкубировать в защищённом от прямого солнечного света месте 25 мин при температуре (18-26) °С.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).***

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.7. Измерить величину оптической плотности (ОП) растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны - 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср.}$ $К^-$).

9.2. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с $К^-$ не более 0,2;

– значение ОП в лунке с $К^+$ не менее 0,5.

9.3. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.}К^- + 0,2$$

Вычислить коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$КП = ОП_{обр.} / ОП_{крит.},$$

где $ОП_{обр.}$ – значение ОП в лунке с контрольным или анализируемым образцом.

9.4. Результат анализа считается положительным, если $КП_{обр.} \geq 1,1$.

Результат анализа считается отрицательным, если $КП_{обр.} < 0,8$.

Результат анализа считается пограничным, если $0,8 \leq КП_{обр.} < 1,1$,

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

где $КП_{обр.}$ – КП исследуемого образца.

В случае пограничного результата рекомендуется повторно исследовать эти образцы параллельно с образцами данных пациентов, взятыми через 2–5 дней.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев[1] со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

10.6. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

11 Не верифицировано данными исследования в режиме реального времени

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