

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач ГУ Республиканский
центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья

_____ А.Л. Скуранович
« 25 » _____ 2024 г.



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G К КОРОНАВИРУСУ SARS-COV-2 МЕТОДОМ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
АНАЛИЗА «SARS-COV-2-NP-ИФА-G»

Инструкция по применению

Минск, 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для выявления
иммуноглобулинов G к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного
анализа «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G»
ТУ РБ 100558032.423-2020 изм.1

Основой набора реагентов для выявления иммуноглобулинов G к коронавирусу SARS-CoV-2 (далее набор) является рекомбинантный вирусспецифический белок. Основным свойством набора является его способность выявлять 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 иммунопероксидазного конъюгата.

НАЗНАЧЕНИЕ

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

СОСТАВ НАБОРА

- Планшет полистирольный с 12 разборными стрипами, на поверхности лунок которого адсорбирован рекомбинантный SARS-CoV-2 специфический полипептид		1 шт.
- ПК - сыворотка крови человека, содержащая IgG к коронавирусу SARS-CoV-2	№1	4 фл.
- ОК - сыворотка крови человека, не содержащая IgG к коронавирусу SARS-CoV-2	№2	4 фл.
- Конъюгат пероксидазный* - мышинный конъюгат к IgG человека, меченный пероксидазой	№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.
- Инструкция по применению		1 шт.

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

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.

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 «Эппендорф» 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.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

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 3 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.

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 перемешать. 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 раствора для разведения образцов/конъюгата (№4), тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 сек, визуально контролируют полноту растворения; ОК (№2) растворяют в 0,4 мл раствора для разведения образцов/конъюгата (№4). После первого использования флаконы с ПК и ОК замораживают и используют при повторных постановках. Замораживание-оттаивание более 2-х раз не рекомендуется.

• Приготовление разведений исследуемых образцов. Образцы исследуют в разведении 1:100 на растворе для разведения контролей/образцов/конъюгата.

В пробирку вносят 495 мкл раствора для разведения образцов/конъюгата (№4) + 5 мкл исследуемого образца – разведение 1:100.

- 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	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400	0,450	0,500	0,550	0,600
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

3 Постановка иммуноферментного анализа (ИФА)

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

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°C и используют в течение 3-х месяцев после вскрытия.

3.3 ПК, ОК вносят в лунки планшета в объеме 0,1 мл. Каждый из исследуемых образцов вносят в 1 лунку планшета в объеме 0,1 мл.

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

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, выдерживают 30 сек, удаляют содержимое и повторяют эту процедуру еще 3 раза.

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. 3.4).

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

3.7 Планшет выдерживают в течение 10 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.

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

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 ср. 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 лунке 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 неопределенного результата проводят повторное исследование образца, взятого через 7-10 дней, если при повторном исследовании получают неопределенный результат, образец считают отрицательным.

Схема учета и интерпретации результатов

ПОП	Результата
ПОП <i>иссл.</i> $\leq$ ПОПкр. 1	Отрицательный , образец оценивается как не содержащий иммуноглобулины G к коронавирусу SARS-CoV-2
ПОП <i>иссл.</i> $\geq$ ПОПкр. 2	Положительный , образец оценивается как содержащий иммуноглобулины G 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.

КП = ПОП исследуемого образца / ПОПкр.2

КРАТКАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИФА «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G»

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°C
Промыть 4 раза	
100 мкл рабочего раствора конъюгата	40 мин при 37°C
Промыть 8 раз	
100 мкл ТМБ	10 мин от начала внесения в защищенном от света месте при комнатной температуре
100 мкл стоп-реagenta	
Провести спектрофотометрию проб: длина волны измерения - 450 нм, фоновая - 620 нм.	

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Сероконверсия в отношении IgG к SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 начинает регистрироваться, как правило, на 7 – 10 сутки с момента появления клинических симптомов, на 16 сут. IgG обнаруживаются у 99% пациентов, затем 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, включающими результаты ПЦР и клинической диагностики.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Чувствительность

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

При тестировании 28 образцов сывороток пациентов с диагнозом COVID-19, проходящих лечение в городской клинической инфекционной больнице г. Минска, IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 были выявлены у 100% пациентов.

Специфичность

Специфичность набора при тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток, не содержащих IgG 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.

Воспроизводимость

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

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 плюс 2°C до 8°C в течение 24 часов. При получении набор необходимо разукomплектовать и хранить в соответствии с вышеуказанными температурами.

Разработчики:

Заведующий лабораторией инфекций с
природным резервуаром, д.м.н., проф.

Т. В. Амвросьева

Вед. науч. сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром, к.б.н.

Н. В. Поклонская

Науч. сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром

О. Н. Казинец

Науч. сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром

З. Ф. Богуш

Науч. сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром

И. В. Бельская

Млад. науч. сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром

И. С. Казловский

Млад. научный сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром

Ю. Б. Колтунова

Научный сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром

А. С. Аринович

« 04 » 07 2024г.

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач ГУ Республиканский
центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья

«25» _____ 2024 г.



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
«SARS-CoV-2-NP-ИФА-М»

Инструкция по применению

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для выявления
иммуноглобулинов М к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного
анализа «SARS-CoV-2-NP-ИФА-М»
ТУ РБ 100558032/423-2020 изм.1

Основой набора реагентов для выявления иммуноглобулинов М к коронавирусу SARS-CoV-2 (далее набор) является рекомбинантный вирусспецифический белок. Основным свойством набора является его способность выявлять IgM 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 иммунопероксидазного конъюгата.

НАЗНАЧЕНИЕ

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

СОСТАВ НАБОРА

- Планшет полистирольный с 12 разборными стрипами, на поверхности лунок которого адсорбирован рекомбинантный SARS-CoV-2 специфический полипептид		1 шт.
- ПК - сыворотка крови человека, содержащая IgM к коронавирусу SARS-CoV-2	№1	4 фл.
- ОК - сыворотка крови человека, не содержащая IgM к коронавирусу SARS-CoV-2	№2	4 фл.
- Конъюгат пероксидазный* - мышинный конъюгат к IgM человека, меченный пероксидазой	№3	1 фл.
- 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.
- Инструкция по применению		1 шт.

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

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, инаktivирована 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.

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 «Эппендорф» 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.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1 Взятие биологического материала

Исследуемый материал – сыворотка или плазма крови без признаков выраженного гемолиза, или хилеза.

Кровь пациентов отбирают не ранее 8 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 3 дней при температуре от 2 до 8° С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре минус 20°C в течение шести месяцев, при температуре минус 70°C 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.

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 перемешать. 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 раствора для разведения образцов/конъюгата (№4), тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 сек, визуально контролируют полноту растворения; ОК (№2) растворяют в 0,8 мл раствора для разведения образцов/конъюгата (№4). После первого использования флаконы с ПК и ОК замораживают и используют при повторных постановках. Замораживание-оттаивание более 2-х раз не рекомендуется.

- Приготовление разведений исследуемых образцов. Образцы исследуют в разведении 1:100 на растворе для разведения контролей/образцов/конъюгата.

В пробирку вносят 495 мкл раствора для разведения образцов/конъюгата (№4) + 5 мкл исследуемого образца – разведение 1:100.

• 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), необходимый объем конъюгата пероксидазного (№3) переносят в чистый флакон и разводят соответствующим объемом раствора для разведения образцов/конъюгата (№4). 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	0,033	0,066	0,099	0,132	0,165	0,198	0,231	0,264	0,297	0,330	0,363	0,396
Количество раствора для разведения образцов/конъюгата (№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

3 Постановка иммуноферментного анализа (ИФА)

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

3.1 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°C и используют в течение 3-х месяцев после вскрытия.

3.2 ПК, ОК вносят в лунки планшета в объеме 0,1 мл. Каждый из исследуемых образцов вносят в 1 лунку планшета в объеме 0,1 мл.

Планшет накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 1,0 ч при температуре (37 ± 1)°C.

3.2 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, выдерживают 30 сек, удаляют содержимое и повторяют эту процедуру еще 3 раза.

3.3 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата. Инкубируют 40 мин при (37 ± 1)°C. Промывают 8 раз рабочим промывочным раствором.

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

3.5 Планшет выдерживают в течение 10 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.

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

4 Учет 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:

ПОПкр.1 = ПОП ОК ср. × 2,1

ПОПкр.2 = ПОП ОК ср. × 3

Результат считают **отрицательным**, если ПОП в лунке с исследуемым образцом (ПОП **иссл.**) ≤ ПОПкр. 1

Результат считают **положительным**, если ПОП **иссл.** ≥ ПОПкр. 2

Результат считают **сомнительным**, 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.

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

КП = ПОП исследуемого образца / ПОПкр.2

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Сероконверсия в отношении IgM к SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 начинает регистрироваться, как правило, на 5 – 8 сутки с момента появления клинических симптомов, среднее время сероконверсии, по опубликованным данным – 12,6 сут. с момента появления клинических симптомов. Максимальное количество

IgM к SARS-CoV-2 в крови пациентов регистрируется на 22-23 сутки. Отмечаются значительные индивидуальные отличия как во времени сероконверсии, так и в количестве обнаруживаемых IgM. Уровни IgM начинают снижаться спустя 21-30 дней с момента появления клинических симптомов.

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.

Возможно получение ложноположительного результата вследствие неспецифического взаимодействия с интерфероном, ревматоидным фактором, неспецифическими IgM.

Особенностью иммунного ответа на инфекцию, вызванную коронавирусом SARS-CoV-2 (также как и коронавирусами SARS и MERS), является практически одновременное появление IgM, IgG и IgA, поэтому IgM не может рассматриваться как маркер активной инфекции.

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

КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Чувствительность

Чувствительность набора составила 98% при тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток, содержащих IgM к коронавирусу SARS-CoV-2 (20 проб).

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.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 12 месяцев с даты изготовления.

Хранение набора осуществляют при температуре от плюс 2°C 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 плюс 20°C до плюс 8°C в течение 24 часов. При получении набор необходимо разукрупнить и хранить в соответствии с вышеуказанными температурами.

Разработчики:

Заведующий лабораторией инфекций с природным резервуаром, д.м.н., проф.

Т. В. Амвросьева

Вед. науч. сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром, к.б.н.

Н. В. Поклонская

Науч. сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром

О. Н. Казинец

Науч. сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром

З. Ф. Богуш

Млад. науч. сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром

И. В. Бельская

Млад. науч. сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром

И. С. Казловский

Млад. научный сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром

Ю. Б. Колтунова

Млад. научный сотрудник лаборатории

инфекций с природным резервуаром

А. С. Аринович

« 07 » 07 2024 г.;

Протокол испытаний от 08.06.2020 г.

Наименование препаратов: НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2 МЕТОДОМ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА «SARS-CoV-2-РекИФА-М» (серия 1, годен до
25.05.2020)

ТУ ВУ 100558032.423-2020

№ государственной регистрации

Инв. № 1512/06-2020

Дата начала испытаний: 08.06.2020г.

Дата окончания испытаний: 08.06.2020г.

Испытания проводили на базе клинико-диагностической лаборатории УЗ «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска

Схема нанесения контролей и образцов исследуемого клинического материала, ПОП, полученные в результате испытаний, а также интерпретация полученных результатов приведены в приложении 1.

Заключение по результатам испытаний: В результате проведенных исследований установлено – положительные и отрицательные контроли среагировали в соответствии с параметрами, заложенными в инструкции по применению, положительные сыворотки определены как положительные, отрицательные определены как отрицательные.

При параллельном исследовании одной и той же пробы получены воспроизводимые результаты.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-РекИФА-М» (Серия 1, годен до 25.05.2021 г.) соответствует требованиям ТУ ВУ 100558032.423-2020 и инструкции по применению

Испытания провели:

Врач лабораторной диагностики, к.м.н.

Рогачева Т.А.

Фельдшер-лаборант

Метлицкая Е.А.

Зав. клинико-диагностической
лабораторией, к.м.н. Анисько Л.А.



Главный врач А.Л.Скуранович

1

Протокол испытаний от 29.05.2020 г.

Наименование препаратов: НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G (IgG) К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2 МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА «SARS-CoV-2-РекИФА-G» (серия 1, годен до 25.05.2020) ТУ ВУ 100558032. -2020

№ государственной регистрации

Инв. № 1508/05-2020

Дата начала испытаний: 28.05.2020г.

Дата окончания испытаний: 28.05.2020г.

Испытания проводили на базе клинико-диагностической лаборатории УЗ «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска

Схема нанесения контролей и образцов исследуемого клинического материала, ПОП, полученные в результате испытаний, а также интерпретация полученных результатов приведены в приложении 1.

Заключение по результатам испытаний: В результате проведенных исследований установлено – положительные и отрицательные контроли среагировали в соответствии с параметрами, заложенными в инструкции по применению, положительные сыворотки определены как положительные, отрицательные определены как отрицательные.

При параллельном исследовании одной и той же пробы получены воспроизводимые результаты.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-РекИФА-G» (Серия 1, годен до 25.05.2021 г.) соответствует требованиям ТУ ВУ 100558032. -2020 и инструкции по применению

Испытания провели:

Врач лабораторной диагностики, к.м.н.

Рогачева Т.А.

КДЛ УЗ «ГКИБ»

Фельдшер-лаборант

Метлицкая Е.А.

Зав. клинико-диагностической лабораторией, к.м.н. Анисько Л.А.

Главный врач
Л.Скуранович