УТВЕРЖДАЮ
Главный врач ГУ Республиканский
центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья
_____ А.Л. Скуранович
«25» _____ 2024 г.

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

Инструкция по применению

Минск, 2024 г.

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

инстр

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 иммунопероксидазного коньюгата.

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)

СОСТАВ НАБОРА

- Планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным коронавирус 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 (х26), допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°С)	**№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 сывороток		1 шт.
- Инструкция по применению		1 шт.

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

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)°С (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);

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

- холодильник/морозильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2 до плюс 8^{0}С и от минус 16 до минус 20^{o}С (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^o С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре от минус 16°С до минус 20°С в течение шести месяцев, при температуре минус 70^{o}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 коронавирус 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 (х26), мл – фл. **№5**	3	6	**10**	12	15	**18**	21	24	**27**	30	33	**36**
Количество дистиллированной воды, мл	75	150	**250**	300	375	**500**	525	600	**675**	750	825	**900**

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

- 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 0,5 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 образцов/конъюгата (РР О/К).

Способ 1. В пробирку типа эппендорф вносят 495 мкл раствора РРО/К (№4) + 5 мкл исследуемого образца, 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 РРО/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.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), 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 коньюгата пероксидазного **(№3)**, мл	0,025	0,05	**0,075**	0,100	0,125	**0,150**	0,175	0,200	**0,225**	0,250	0,275	**0,300**
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.

3.2 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.

3.3 ПК, ОК вносят в лунки планшета в объеме 0,1 мл. Каждый из исследуемых образцов при их разведении **способом 1** вносят в лунки планшета в объеме 0,1 мл.

При подготовке исследуемых образцов **способом 2** после внесения ПК и ОК, в остальные лунки планшета вносят по 90 мкл РРО/К **(№4)**. Каждый из исследуемых образцов, предварительно разведенных в 1:10 раз, вносят в объеме по 10 мкл в лунки планшета для постановки ИФА - получают конечное разведение – 1:100.

После внесения в лунки ПК, ОК и образцов планшет накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет с защелкой и инкубируют в термостате в течение 1,0 ч при температуре (37 ± 1)^{0}С.

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.

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

3.5 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата. Инкубируют 40 мин при (37 ± 1)^{0}С. Промывают 8 раз рабочим промывочным раствором.

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

3.7 Планшет выдерживают в течение 5 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 ПКср. 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.× 2,8

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 **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 иссл. ≤ **ПОПкр. 1**	**Отрицательный**, образец оценивается как не содержащий суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2
ПОП иссл. ≥ **ПОПкр. 2**	**Положительный**, образец оценивается как содержащий суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2
ПОПкр. 1 < ПОП иссл. < **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-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) или* (90 мкл РРО/К (№ 4) + 10 мкл в лунках планшета для предварительного разведения сывороток) (разведение 1:10), переносим в лунки планшета для постановки ИФА, в которые добавили по 90	**1 ч** при 37 °С

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

мкл РРО/К, по 10 мкл (разведение 1:100)	
Промыть 4 раза	
100 мкл рабочего раствора конъюгата	**40 мин** при 37 °С
Промыть 8 раз	
100 мкл ТМБ	**5 мин** от начала внесения в защищенном от света месте при комнатной температуре
100 мкл стоп-реагента	
Провести спектрофотометрию проб: длина волны измерения - 450 нм, фоновая - 620 нм.	

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.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

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.

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 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.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 12 месяцев с даты изготовления.

Хранение набора осуществляют при температуре от плюс 2^0С до 8°С в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности за исключением реагента №3, который хранится при температуре от минус 16 °С до минус 20°С. Транспортирование набора осуществляют при температуре от плюс 2^0С до 8°С в течение 24 часов. При получении набор необходимо разукомплектовать и хранить в соответствии с указанными на упаковке условиями.

Заведующий лабораторией инфекций с природным резервуаром, д.м.н., проф.
_____Т. В. Амвросьева
Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром, к.б.н.
_____Н. В. Поклонская
Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____О. Н. Казинец
Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____З. Ф. Богуш
Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____И. В. Бельская
Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____И. С. Казловский
Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____Ю. Б. Колтунова
Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____А. С. Аринович
«01»__07____2024 г.

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