

ООО «МЕДИПАЛТЕХ»
Россия, Московская область, г. Дубна

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «МЕДИПАЛТЕХ»
Мануйлов В. А.

«___» _____ 2020 г
дата подписи

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их авидности в сыворотке или плазме крови человека
«SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG»
по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020
(Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG»)

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В НАУЧНЫХ ЦЕЛЯХ

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их авидности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020 (Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG») выпускается в одном варианте исполнения:

Кат. № МТ-И-С1-03.192

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их авидности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG», 192 определения

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы.

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	4
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	6
4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	8
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	9
7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, ИХ ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ.....	10
8. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ	11
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	12
10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	14
11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	15
12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.....	16
13. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	18
14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	18
15. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	19
16. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ.....	20
17. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	20
18. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	20
19. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	21

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их авидности в сыворотке или плазме крови человека

«SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG»

по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020

(Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их авидности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020 (далее – «Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG»») предназначен для качественного выявления иммуноглобулинов класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 человека и определения индекса авидности (далее - ИА) данных иммуноглобулинов в сыворотке или плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (далее – ИФА).

1.2. Показания и противопоказания к применению набора реагентов.

Только для профессионального использования.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» предназначен только для однократного применения по назначению.

Только для диагностики *in vitro*.

Противопоказаний и побочных эффектов при работе с набором реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» не выявлено.

1.3. Область применения: научные исследования.

1.5. Потенциальный пользователь.

Специалисты с высшим медицинским, биологическим или химическим образованием и квалификацией, соответствующей специальностям «Клиническая лабораторная диагностика», «Вирусология» (в соответствии с квалификационными требованиями, установленными Приказом Минздрава России от 8 октября 2015 года N 707н, с изм. на 04.09.2020 г.); специалисты со средним медицинским образованием и квалификацией, соответствующей специальностям «Лабораторная диагностика», «Лабораторное дело» (в соответствии с квалификационными требованиями, установленными Приказом Минздрава России от 10 февраля 2016 года N 83н); специалисты с высшим биологическим образованием и квалификацией, соответствующей профессиональному стандарту «Специалист в области клинической лабораторной диагностики» (в соответствии с квалификационными требованиями, установленными Приказом Министерства труда и социальной защиты РФ от 14 марта 2018 г. № 145н), окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности.

1.6. Условия эксплуатации.

Анализы проводятся в условиях научных и клинико-диагностических лабораторий.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Для качественного определения специфических SARS-CoV-2 антител используют метод ИФА. На внутренней поверхности лунок иммуносорбента иммобилизован рекомбинантный антиген коронавируса SARS-CoV-2. При внесении в лунки исследуемых образцов, антитела, специфические к SARS-CoV-2, в случае их наличия связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Во время второй инкубации образовавшиеся комплексы выявляют при помощи конъюгата антител к IgG человека с пероксидазой. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор субстрата пероксидазы с хромогеном. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках иммуносорбента при длине волны 450/620-700 нм, которая пропорциональна содержанию специфических к SARS-CoV-2 антител в исследуемых образцах.

Для определения индекса avidности антител IgG каждый образец сыворотки или плазмы крови человека исследуют в дубликатах методом ИФА в двух параллельных лунках планшет с иммобилизованным рекомбинантный антигеном коронавируса SARS-CoV-2. При этом антитела, специфические к SARS-CoV-2, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. После однократной отмывки несвязавшихся антител в контрольные лунки (ФБ-лунки) - вносят фосфатный буфер, в опытные (ДР-лунки) - денатурирующий раствор, который вызывает диссоциацию комплексов антител с антигеном. Степень диссоциации зависит от avidности антител в исследуемом образце. После отмывки в лунки добавляют конъюгат - мышинные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор субстрата пероксидазы с хромогеном. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках иммуносорбента при длине волны 450/620-700 нм. Avidность антител в исследуемом образце коррелирует со снижением оптического поглощения в лунке, обработанной денатурирующим раствором, в сравнении с контрольной лункой.

2.2. Состав набора

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их avidности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020 (Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG») выпускается в одном варианте исполнения:

Кат. № МТ-И-С1-03.192.

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и их индекса avidности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG», 192 определений.

Набор рассчитан на проведение анализа:

при качественном определении антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека – на 192 определения, включая постановки контрольных образцов;

при определении индекса avidности антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека – на 96 определений образцов, предоставляемых в дубликатах, включая контрольные.

В целях экономии реагентов производитель рекомендует использовать вариант анализа на определение индекса avidности только для образцов, уже определенных как положительные на содержание антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 в качественном ИФА-анализе с использованием того же набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG», поскольку для отрицательных на содержание антител образцов индекс avidности не определяется.

Состав набора представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG».

Код	Наименование компонента	Кол-во
P1	Иммунсорбент – 96-луночный разборный планшет с иммобилизованным рекомбинантным белком SARS-CoV-2 - включает 12 восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности рекомбинантным структурным белком SARS-CoV-2	2 шт.
P2-1	Положительный контрольный образец № 1 (K1+) - инактивированный, содержит высокоавидные IgG к SARS-CoV-2	1x 3 мл
P2-2	Положительный контрольный образец № 2 (K2+) - инактивированный, содержит низкоавидные IgG к SARS-CoV-2	1x 3 мл
P3	Отрицательный контрольный образец (K-) - инактивированный, не содержит IgG к SARS-CoV-2	2x2,5 мл
P4-1	Раствор для предварительного разведения образцов	1x25 мл
P4-2	Раствор для разведения образцов	1x25 мл
P5	Конъюгат - конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.	1x25 мл
P6-1	Хромоген - содержит 3,3',5,5'- тетраметилбензидин	1x2,5 мл
P6-2	Раствор для разведения хромогена - цитратный буферный раствор с перекисью водорода	1x25 мл
P7	Концентрат промывочного раствора, 25-кратный - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с Твин-20	2x50 мл
P8	Стоп-реагент - содержит серную кислоту	1x25 мл
P9	Денатурирующий раствор - содержит мочевины	1x17 мл
P10	Фосфатный буфер	1x17 мл
	Планшет для предварительного разведения образцов	2 шт.
	Клейкая пленка для заклеивания иммунсорбента	4 шт.
	Одноразовые ванночки для реагентов	4 шт.
	Одноразовые наконечники к дозаторам (до 300 мкл)	32 шт.
	Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.
	Паспорт	1 шт.

2.3. Время проведения качественного определения антител к коронавирусу SARS-CoV-2 – 1 час 15 мин.

Время проведения определения индекса avidности антител к коронавирусу SARS-CoV-2 – 1 час 25 мин.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа анализируемых образцов и каждая индивидуальная постановка ИФА с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» должны включать контрольные образцы:

- отрицательный контрольный образец (P3) – не содержит IgG к SARS-CoV-2;
- положительный контрольный образец № 1 (P2-1) - содержит IgG к SARS-CoV-2 с ИА $\geq 50\%$;
- положительный контрольный образец № 2 (P2-2) - содержит IgG к SARS-CoV-2 с ИА $\leq 40\%$.

Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, приведенным в разделе 10 настоящей инструкции. В случае получения невалидных результатов для контролей не может быть гарантировано соответствие полученных результатов выявления заявленным аналитическим характеристикам, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Качественное определение антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2

Чувствительность – отношение количества выявленных положительных сывороток тестируемой панели, к их сумме с количеством ложноотрицательных результатов - 100%.

Специфичность – отношение количества выявленных отрицательных сывороток тестируемой панели, к их сумме с количеством ложноположительных результатов - 100%.

Коэффициент вариации (CV) – относительный показатель разброса результатов определения (ед. опт. плотности), рассчитанный как отношение среднеквадратичного отклонения к среднеарифметическому – не более 8%.

Для определения параметров использована рабочая панель контрольных образцов предприятия-изготовителя.

4.2 Определение индекса avidности антител класса G к SARS-CoV-2

Точность (precision) – отношение количества правильно выявленных сывороток тестируемой панели (например, высокоавидных), к их сумме с количеством неправильно выявленных результатов (например, низкоавидных сывороток, ошибочно определенных как высокоавидные) - 100 %.

Полнота (recall) – отношение правильно выявленных сывороток тестируемой панели (например, высокоавидных) к их истинному числу - 100%.

Для определения параметров использована рабочая панель контрольных образцов предприятия-изготовителя.

4.3. Аналитическая специфичность (перекрёстная реактивность)

Для оценки аналитической специфичности (перекрестной реактивности) использовали образцы сыворотки крови от пациентов, содержащих специфические антитела и антигены: антитела класса IgG к аденовирусной инфекции, IgG и IgM к цитомегаловирусу (CMV), антитела классов IgG и IgM к вирусу краснухи, антитела класса IgG к вирусу кори, антитела классов IgG и IgM к вирусу герпеса 1 и 2 типа, антитела класса IgG к раннему антигену вируса Эпштейна-Барр, антитела к HCV, антитела IgM к ядерному антигену гепатита В(НВс), ВИЧ, беременных женщин. Перекрестно реагирующих образцов обнаружено не было.

4.4. Интерферирующие вещества.

Максимально патологические концентрации гемоглобина (2 г/л), общего билирубина (500 мкМ) и триглицеридов (10 мМ) в клинических образцах не влияют на результат анализа.

4.5. Воспроизводимость

Внутрисерийный коэффициент вариации результатов выявления антител класса G к SARS-CoV-2 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» не превышает 8,0%.

Внутрисерийный коэффициент вариации результатов измерения индекса avidности антител класса G к SARS-CoV-2 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» не превышает 8,0%.

4.6. Валидация типа пробы (гепаринизированная плазма)

Было проведено сравнение результатов определения антител к SARS-CoV-2 IgG, полученных в 50 образцах сыворотки и плазмы крови (антикоагулянт: гепарин лития), взятой одновременно у одних и тех же доноров.

Было получено 25 отрицательных результатов на наличие и 25 положительных результатов, и рассчитана чувствительность и специфичность по формулам:

1) Чувствительность (плазма)

Чувствительность % = (Положительные результаты плазма / Положительные результаты сыворотка) x 100% = (25/25; ДИ 95% 86,28– 100%); 100%

2) Специфичность (плазма).

Специфичность % = (отрицательные результаты плазма / отрицательные результаты сыворотка) x 100 (25/25; ДИ 95% 86,28– 100%); 100%.

По полученным данным можно сделать вывод об эквивалентности определения антител IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке и гепаринизированной плазме.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» по ГОСТ 31508–2012 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» и Номенклатурной классификации медицинских изделий, утв. Приказом Минздрава Российской Федерации от № 4н от 6 июня 2012 года (в ред. Приказа Минздрава России от 25.09.2014 N 557н) – класс 2б.

Общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011.

5.2. Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» предназначен только для профессионального использования. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории, отвечающей требованиям СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». При работе с Набором требуется соблюдать «Инструкцию по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утв. Минздравом СССР 17 января 1991 года; ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- рассматривать исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные;
- инактивировать исследуемые образцы биологического материала в соответствии с санитарными правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»;
- применять набор реагентов строго по назначению;
- допускать к работе с набором реагентов только специально обученный персонал с высшим и средним медицинским или биологическим образованием, соответствующий квалификационным требованиям, перечисленным в п. 1.5 настоящей Инструкции и окончивший соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности.

5.3. Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

5.4. Все компоненты набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG», за исключением стоп-реагента (P8) являются нетоксичными. Стоп-реагент (P8, содержит серную кислоту) классифицируется как опасный. Необходимо избегать контакта стоп-реагента с кожей и слизистыми оболочками. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Следующие реагенты: положительный контрольный образец №1 (P2-1, K1+), положительный контрольный образец №2 (P2-2, K2+), отрицательный контрольный образец (P3, K-) не классифицируются, как опасные, однако содержат в своем составе инактивированные компоненты крови человека, что необходимо учитывать при работе в соответствии с п. 3.2 настоящего раздела.

Во всех компонентах набора реагентов отсутствуют антитела к *Treponema pallidum*, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).

5.5. Все компоненты, входящие в состав набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG», предназначены для диагностики «in vitro».

5.6. При работе с набором реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток), так как исследуемые образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.

5.7. Нельзя пипетировать растворы ртом.

5.8. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5.9. Все промывные растворы следует собирать в специальный контейнер и обрабатывать дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке.

5.10. Все твердые отходы следует собирать в специальный контейнер, обеззараживать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

5.11. Лабораторную посуду многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.

5.12. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70% раствором этилового спирта.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. При проведении ИФА с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» требуется следующее оборудование:

- термостатируемый шейкер, поддерживающий температуру ($37 \pm 2^\circ\text{C}$);
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- планшетный фотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм и 620-700 нм;
- центрифуга настольная на $(3-10) \times 10^3$ об/мин для получения и осветления образцов сыворотки/плазмы крови;
- дистиллятор;
- холодильник, обеспечивающий температуру хранения в диапазоне $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$;
- дозаторы пипеточные одноканальные, позволяющие работать с объемами в диапазоне 5-1000 мкл и сменные наконечники к ним;
- дозатор пипеточный многоканальный, позволяющий работать с объемами в диапазоне 10-300 мкл и сменные наконечники к ней;
- таймер электронный;
- прибор (комбинированный термометр), позволяющий измерять температуру воздуха в диапазоне $0-25^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$, относительную влажность – 20-90%.

Оборудование должно быть поверено или аттестовано в установленном порядке в соответствии с предъявляемыми требованиями.

6.2. При проведении ИФА с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» требуются следующие расходные материалы, не входящие в состав набора:

- вода дистиллированная;
- спирт этиловый, 70%;
- вата гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- мерный стакан или цилиндр (1000 мл);
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для осветления, хранения образцов сыворотки/плазмы (типа «Eppendorf», Германия, кат. № 0030 120.167, 0030 110.005);
- перчатки резиновые хирургические по ГОСТ 3-88;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- контейнер для твердых загрязненных отходов;
- контейнер для загрязненных жидкостей.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, ИХ ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ

Для исследования используют биологический материал – сыворотку или гепаринизированную плазму крови человека.

7.1. Все работы по отбору проб от больных, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводить в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

7.2. Допустимо использование образцов сывороток крови и плазмы крови с антикоагулянтом гепарин лития.

7.3. Образцы сывороток или плазмы крови хранить при температуре 2-8°C не более 120 часов.

7.4. Образцы сывороток (гепаринизированной плазмы), содержащие агрегаты и осадок, осветлять с помощью центрифугирования. Центрифугировать при 3000 об/мин 10-15 мин. при температуре 18° - 25°C.

7.5. Допустимо замораживание образцов для более длительного хранения (до температуры минус 20°C и ниже) не более двух раз.

7.6. Образцы сывороток (гепаринизированной плазмы), подвергнутые замораживанию, перед проведением исследования, следует тщательно перемешать и осветлить с помощью центрифугирования.

7.7. Во избежание получения ложноположительных результатов образцы сывороток (гепаринизированной плазмы) крови с выраженным гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным обсеменением (повышенной мутностью) рекомендуется не использовать.

8. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

8.1. Компоненты набора и анализируемые образцы должны быть выдержаны при комнатной температуре (18-25)°С не менее 60 минут до начала проведения анализа. После вскрытия набора компоненты набора следует хранить при температуре 2-8° С.

8.2. Жидкие реагенты, готовые к использованию:

- конъюгат (P5);
- стоп-реагент (P8)
- денатурирующий раствор (P9)
- фосфатный буфер (P10)

8.3. Унифицированные неспецифические реагенты (взаимозаменяемые реагенты для наборов разных серий набора реагентов):

- концентрат промывочного раствора, 25-кратный (P7);
- стоп-реагент (P8).

8.4. Приготовление иммуносорбента (P1).

Вскройте пакет и извлеките иммуносорбент. Установите на рамку планшета необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы уберите обратно в пакет, герметично закройте и храните их при температуре 2-8°С в течение всего срока годности.

Хранение: неиспользованные стрипы храните в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре 2-8°С в течение всего срока годности.

8.5. Приготовление промывочного раствора.

Перенесите необходимое количество концентрата промывочного раствора (P7) из флакона в мерный стакан и разведите его в 25 раз дистиллированной водой, тщательно перемешайте (см. таблицу 2).

Хранение: неиспользованный вскрытый концентрат промывочного раствора (P7) хранить при температуре 2-8°С в течение всего срока годности, приготовленный промывочный раствор храните при комнатной температуре +18-25°С не более 15 дней или при температуре +2-8°С не более 30 дней.

8.6. Приготовление индикаторного раствора.

За 5-10 мин до окончания реакции с конъюгатом приготовьте индикаторный раствор. Для этого отберите необходимый объем хромогена (P6-1), поместите в чистую емкость и разведите его в 11 раз раствором для разведения хромогена (P6-2) (см. таблицу 2).

Тщательно перемешайте.

Перед использованием индикаторный раствор должен быть бесцветным.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Посуду, применяемую для его приготовления, отмывают без применения синтетических моющих средств.

Хранение: Готовый индикаторный раствор хранению не подлежит.

Таблица 2.- Таблица расхода реагентов.

Реагенты	КОЛИЧЕСТВО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СТРИПОВ											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА												
Р7, мл	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дист. вода, мл, до	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИНДИКАТОРНОГО РАСТВОРА												
Р6-1, мл	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
Р6-2, мл	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10	11	12

ВАЖНО: необходимо учитывать, что вариант постановки анализа для определения индекса avidности антител предусматривает постановку каждого образца, включая контрольные, в дубликатах (см. разд. 9.2). Поэтому в данном варианте постановки количество используемых стрипов будет в два раза больше, чем в варианте качественного определения IgG, что нужно планировать при приготовлении выбранных объемов реагентов.

8.7. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения образцов (Р4-1). Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения образцов по 90 мкл раствора для предварительного разведения образцов и по 10 мкл образцов сыворотки (плазмы), тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: разведённые в 10 раз образцы хранить не более 3-х часов при температуре (18-22)°С.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Качественное определение антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2

9.1.1. В любые две лунки, например, А-1 и В-1, внесите по 100 мкл отрицательного контрольного образца (Р3), в одну лунку, например, С1 – 100 мкл положительного контрольного образца, либо К1+ (Р2-1), либо К2+ (Р2-2). Для целей качественного определения IgG оба положительных контрольных образца являются равнозначными по характеристикам и получаемым значениям оптической плотности в ИФА.

9.1.2. В остальные лунки внесите по 90 мкл раствора для разведения образцов (Р4-2) и по 10 мкл предварительно разведённых исследуемых образцов (п. 8.7.)

Время внесения контролей и исследуемых образцов не должно превышать 10 минут.

Заклейте планшет клейкой пленкой или накройте крышкой и инкубируйте при температуре (37±2) °С и постоянном встряхивании (700 об/мин) в течение 30 минут.

9.1.3. По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз.

ВНИМАНИЕ! Промывку иммуносорбента рекомендуется проводить с использованием автоматического планшетного промывателя. Допускается промывка лунок многоканальной пипеткой.

Требования к качеству промывки:

- заполните лунки промывочным раствором в объеме не менее 350 мкл в лунку;
- не допускайте переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- выдержите промывочный раствор в лунках иммуносорбента не менее 30 секунд;
- полностью удалите содержимое лунок;
- по окончании промывки удалите остатки жидкости в лунках, перевернув иммуносорбент и постукивая им по фильтровальной бумаге.
- не допускайте высыхания лунок используемого иммуносорбента между отдельными стадиями.

Некачественное промывание иммуносорбента может привести к получению некорректных результатов.

9.1.4. Внесите в лунки по 100 мкл конъюгата (P5).

Заклейте планшет клейкой пленкой или накройте крышкой и инкубируйте в термостате при температуре $(37\pm 2)^\circ\text{C}$ и постоянном встряхивании (700 об/мин) в течение 30 минут.

9.1.5. По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз (см. 9.3.)

9.1.6. Внесите в лунки по 100 мкл индикаторного раствора(п.).

Выдержите при комнатной температуре в темном месте в течение 15 минут.

9.7. Внесите в лунки по 100 мкл стоп-реагента (P8) для остановки реакции (в той же последовательности внесения, что и индикаторный раствор).

Не более чем через 5 минут после остановки цветной реакции измерьте оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620-700 нм).

9.2. Определение индекса avidности антител класса G к SARS-CoV-2

9.2.1. Все образцы исследовать в двух параллельных лунках: ФБ-лунке и ДР-лунке.

Внести по 100 мкл K- (P3), K1+ (P2-1), K2+ (P2-2) в две соседние лунки 2-х вертикальных рядов планшета в соответствии со схемой, представленной на рис.1.

9.2.2. В остальные лунки внесите по 90 мкл раствора для разведения образцов (P4-2) и по 10 мкл предварительно разведённых исследуемых образцов (п. 8.7.) в каждые две соседние лунки 2-х вертикальных рядов планшета в соответствии со схемой, представленной на рис.1.

Время внесения контролей и исследуемых образцов не должно превышать 10 минут.

Заклейте планшет клейкой пленкой или накройте крышкой и инкубируйте при температуре $(37\pm 2)^\circ\text{C}$ и постоянном встряхивании (700 об/мин) в течение 30 минут.

Рис.1. Схема внесения контрольных и испытуемых образцов сывороток.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K-	K-	№6	№6	№14	№14	№22	№22	№30	№30	№38	№38
B	K1+	K1+	№7	№7	№15	№15	№23	№23	№31	№31	№39	№39
C	K2+	K2+	№8	№8	№16	№16	№24	№24	№32	№32	№40	№40
D	№1	№1	№9	№9	№17	№17	№25	№25	№33	№33	№41	№41
E	№2	№2	№10	№10	№18	№18	№26	№26	№34	№34	№42	№42
F	№3	№3	№11	№11	№19	№19	№27	№27	№35	№35	№43	№43
G	№4	№4	№12	№12	№20	№20	№28	№28	№36	№36	№44	№44
H	№5	№5	№13	№13	№21	№21	№29	№29	№37	№37	№45	№45
	ФБ- лунки	ДР - лунки	ФБ - лунки	ДР - лунки	ФБ- лунки	ДР - лунки						

9.2.3. По окончании инкубации промойте лунки планшета **1 раз** (см. 9.1.3.)

9.2.4. Во все ФБ-лунки (ряды планшета №№ 1, 3, 5, 7, 9, 11) внести по 150 мкл фосфатного буфера, во все ДР-лунки (ряды планшета №№ 2, 4, 6, 8, 10, 12) - по 150 мкл денатурирующего раствора. Выдержать в течение 10 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.

9.2.5. По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз (см. 9.1.3.)

9.2.6. Внесите в лунки по 100 мкл конъюгата (P5).

Заклейте планшет клейкой пленкой или накройте крышкой и инкубируйте в термостате при температуре (37±2)°С и постоянном встряхивании (700 об/мин) в течение 30 минут.

9.2.7. По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз (см. 9.1.3.)

9.2.8. Внесите в лунки по 100 мкл индикаторного раствора(п.).

Выдержите при комнатной температуре в темном месте в течение 15 минут.

9.2.9. Внесите в лунки по 100 мкл стоп-реагента (P8) для остановки реакции (в той же последовательности внесения, что и индикаторный раствор).

Не более чем через 5 минут после остановки цветной реакции измерьте оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620-700 нм).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. Результаты анализа следует учитывать только при соблюдении следующих условий:

Качественное определение антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2

- значения оптических плотностей в лунках с отрицательным контролем (**ОПК-**) должны быть не выше 0,15 оптических единиц (**ОЕ**);

- значения оптических плотностей в лунках с положительными контролями (**ОПК1+** и **ОПК2+**) должны быть не ниже 0,8 ОЕ.

Определение индекса avidности антител класса G к SARS-CoV-2

ОП в ФБ-лунке с К– не более 0,15 о.е.;

ОП в ФБ-лунке с К1+ не менее 0,80 о.е.;

ОП в ФБ-лунке с К2+ не менее 0,80 о.е.

В том случае, если ОП испытуемого образца в контрольной (ФБ) лунке выше 1,9 о.е., провести повторное исследование образца крови в более высоком разведении.

В случае, если ОП испытуемого образца в ФБ-лунке ниже 0,5 о.е., провести исследование образца крови, повторно взятого у пациента через 7-10 суток.

10.2. Качественное определение антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2

Рассчитайте среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контролем (ОПК-ср).

10.3. Вычислите граничное значение оптической плотности (ГЗ) по формуле:

$$\text{ГЗ} = \text{ОПК-ср} + 0,2$$

Для каждого исследуемого образца вычислите индекс позитивности (ИП) по формуле:

$$\text{ИП} = \text{ОПобр} / \text{ГЗ}$$

10.4. Определение индекса avidности антител класса G к SARS-CoV-2

Вычислить индекс avidности (ИА) для контрольных образцов К1+ и К2+ и испытуемых образцов по формуле:

$$\text{ИА} = (\text{ОП}_{\text{ДР-лунка}} / \text{ОП}_{\text{ФБ-лунка}}) \times 100 \% \quad (1)$$

где: ОП_{ДР-лунка} - ОП образца, обработанного денатурирующим раствором

ОП_{ФБ-лунка} - ОП образца в ФБ-лунке

ИА К1+ должен быть не менее 50 %

ИА К2+ должен быть не более 40 %

При получении иных показателей исследование повторить.

Для исследуемых образцов вычислить ИА по приведенной формуле (1).

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Качественное определение антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2

Результат качественного анализа на определения антител класса G считается положительным, если ИПобр. $\geq 1,1$. исследуемого образца меньше ГЗ.

Результат качественного анализа на определения антител класса G считается отрицательным, если ИПобр. $< 0,9$.

Результат качественного анализа на определения антител класса G считается неопределённым, если $0,9 \leq \text{ИПобр.} < 1,1$.

При получении неопределённого результата рекомендуется повторно исследовать образцы данных пациентов, полученные через 7-10 суток.

11.2. Определение индекса avidности антител класса G к SARS-CoV-2

Индекс avidности антител определяются в абсолютных единицах, выражаемых в процентах (ИА%).

При использовании набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG»:

- результат определения ИА антител класса G считается высоким, если $ИА_{обр.} \geq 50\%$;
- результат определения ИА антител класса G считается низким, если $ИА_{обр.} \leq 40\%$;
- результат определения ИА антител класса G считается неопределенным, если $40\% < ИА_{обр.} < 50\%$.

При получении неопределённого результата рекомендуется повторно исследовать образцы одновременно с образцами данных пациентов, полученными через 1 месяц.

Клиническое значение ИА основано на имеющихся литературных данных. Показано, что для острой стадии заболевания COVID-19 и ранней стадии реконвалесценции (0-45 дней после первичной иммунизации) характерно наличие в крови антител с низким индексом avidности [1]. Основываясь на аналогичных данных, полученных для инфекции близкородственным возбудителем SARS-CoV-1 [2], предполагается, что антитела к коронавирусу SARS-CoV-2 приобретают высокий индекс avidности в течение 90 дней после инфекции [3]. В этом отношении определение антител с низким индексом avidности является показателем недавно (до 45 дней) перенесенной первичной инфекции [4-8].

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре (2-8)°С.

12.3. Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА+ИА-IgG» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности (12 мес.).

12.3. Допускается хранение и транспортирование при температуре до 30°С в течение десяти суток. Замораживание не допускается.

12.4 Компоненты набора являются свето- (хромоген, раствор для разведения хромогена) и влагочувствительными (иммуносорбент). Хранить в условиях отсутствия прямого воздействия солнечного света и при влажности не более 80%. Избегать намокания.

12.5. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

12.6. В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы иммуносорбента тщательно заклеить клейкой пленкой для заклеивания иммуносорбента и хранить в упаковке для планшета при температуре +2-8°С в течение всего срока годности набора;

- конъюгат (P5), раствор для предварительного разведения образцов (P4-1), раствор для разведения образцов (P4-2), стоп-реагент (P8), хромоген (P6-1), раствор для разведения хромогена (P6-2), концентрат промывочного раствора (P7), денатурирующий раствор (P9), фосфатный буфер (P10) после вскрытия флаконов хранить при температуре +2-8°С в течение всего срока годности набора.

12.7. Условия хранения рабочих растворов компонентов описаны в разделе 8 настоящей инструкции.

12.8. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- строго придерживаться указаний инструкции по применению;
- не использовать набор после окончания срока годности;
- не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат промывочного раствора (P7), стоп-реагента (P8);
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой;
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку;
- использовать только одноразовые наконечники для дозаторов;
- исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования;
- не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении ИФА.

12.9. Условия применения набора реагентов:

- температура окружающей среды (15 – 35) °С;
- относительная влажность воздуха (не более 80) %;
- атмосферное давление (84,0 – 106,7) кПа / (630 – 800) мм. рт. ст.

12.10. Срок годности набора - 12 мес. от даты изготовления.

12.11. Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.

13. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

13.1. Уничтожение и утилизацию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

13.2. Все промывные растворы, собранные в специальный контейнер и обработанные дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, следует утилизировать как отходы класса В.

13.3. Все твердые отходы, собранные в специальный контейнер, обеззараженные в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», следует утилизировать как отходы класса В.

13.4. Неиспользованные наборы реагентов с истекшим сроком годности перед утилизацией следует разукomплектовать.

13.5. Неиспользованный концентрат промывочного раствора 25-кратный (P7), раствор для предварительного разведения образцов (P4-1), раствор для разведения хромогена (P6-2), денатурирующий раствор (P9), фосфатный буфер (P10) следует утилизировать, как отходы класса А.

13.6. Неиспользованные положительный (P2) и отрицательный (P3) контрольные образцы, конъюгат (P5), раствор для разведения образцов (P4-2) и иммуносорбент (P1) следует обеззараживать и утилизировать, как медицинские отходы класса Б.

13.7. Неиспользованный стоп-реагент (P8) следует утилизировать как отходы класса Г.

13.8. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

14.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

14.2. Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Сроки годности вскрытых компонентов набора реагентов – в течение срока годности набора реагентов. Указанный срок хранения был определен методом «ускоренного старения» в соответствии с ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Исследование стабильности набора реагентов в реальном времени продолжается».

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

15. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Годен до
	Код партии
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Достаточно для проведения n-количества тестов
	Не допускается воздействие солнечного света
	Беречь от влаги
	Внимание! Обратитесь к инструкции
 	<p>«Восклицательный знак», «Жидкости, выливающиеся из двух пробирок и поражающие металл и руку» Сигнальное слово: «Осторожно» При попадании на кожу и в глаза может вызывать раздражение. Обратитесь к инструкции.</p>

16. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

17. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание: Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

18. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «МедипалТех»

Адрес для переписки: 141981 Московская обл. г Дубна, ул. Большеволжская, д. 15, помещение 106.

Телефон для обращений: +7 (499) 300-14-05

Адрес электронной почты: info@medipaltech.ru

19. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu, T., Hsiung, J., Zhao, S. et al. Quantification of antibody avidities and accurate detection of SARS-CoV-2 antibodies in serum and saliva on plasmonic substrates. *Nat Biomed Eng* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00642-4>
2. Chan, K. H. et al. Use of antibody avidity assays for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin. Vaccin. Immunol.* 14, 1433–1436 (2007).
3. Bauer, G. The variability of the serological response to SARS-corona virus-2: potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). *J. Med. Virol.* <https://doi.org/10.1002/jmv.26262> (2020).
4. Gutierrez, J. & Maroto, C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious diseases? A review. *Microbios* 87, 113–121 (1996).
5. Suligoi, B. et al. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4015–4020 (2002).
6. Revello, M. G. et al. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J. Infect. Dis.* 186, 553–557 (2002).
7. De Souza, V. A. U. F. et al. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary Dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1782–1784 (2004).
8. Zhang, B. et al. Diagnosis of Zika virus infection on a nanotechnology platform. *Nat. Med.* 23, 548–550 (2017).