

СОГЛАСОВАНО

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «ПИМУ»
Минздрава России
д.м.н. А. С. Благонравова



**ИНСТРУКЦИЯ
по применению**

**«Набор реагентов
для определения антител класса G к SARS-CoV-2
методом иммуноферментного анализа»
(«ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный»)**



УТВЕРЖДАЮ

**Заместитель генерального директора
ООО «НПО «Диагностические системы»**



О.Н. Шлюдин

2021 г.

REF



**ИНСТРУКЦИЯ
по применению**

**«Набор реагентов
для определения антител класса G к SARS-CoV-2
методом иммуноферментного анализа»
(«ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный»)**

СОДЕРЖАНИЕ

I. НАЗНАЧЕНИЕ	3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА	3
III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
IV. ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	5
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ	8
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ.....	8
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	8
IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ	9
X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	9
XI. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	10
XII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА	11
XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	12
XIV. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И РЕМОНТ	13
XV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	13
XVI. ОБЪЯСНЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СИМВОЛОВ.....	13
Приложение.....	14

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений (один разборный планшет), включая контрольные.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для определения антител класса G к SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа» («ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный») предназначен для количественного и полуколичественного (коэффициент позитивности) определения антител класса G к рецептор - связывающему домену (RBD) spike-белка SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Набор реагентов может быть использован в качестве вспомогательного диагностического средства для лабораторной диагностики текущей инфекции в комплексе с другими исследованиями, а также для оценки иммунного ответа на перенесенную SARS-CoV-2 инфекцию и количественного определения специфических антител класса G, в том числе потенциально обладающих вируснейтрализующим действием, к RBD spike-белка SARS-CoV-2. Например, при проведении исследований среди населения с целью изучения популяционного иммунитета и/или в группах повышенного риска инфицирования, для обследования реконвалесцентов – потенциальных доноров гипериммунной плазмы, для оценки поствакцинального протективного иммунитета.

Предназначен для профессионального использования специально обученным персоналом.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Заболевание COVID-19 вызывается коронавирусом SARS-CoV-2. Данный вирус является новым коронавирусом, способным заражать человека, и третьим коронавирусом, возникшим за последние два десятилетия, вызвавшим вспышки с высокой тяжестью заболевания и значительной смертностью на территории разных стран. Симптомы COVID-19 не имеют отличительных признаков и совпадают с симптомами других тяжелых респираторных инфекций MERS-CoV и SARS-CoV.

Выявлены четыре значимых для жизненного цикла SARS-CoV-2 структурных белка. Гомотримеры S-белков формируют «шипы» на поверхности вирусных частиц, что позволяет обеспечить прикрепление вируса к рецептору «хозяина». М-белок имеет три трансмембранных домена, способствует формированию вирионов. Е-белок участвует в сборке и высвобождении вируса. N-белок содержит два домена, которые могут связываться с вирусной РНК.

S-белок состоит из двух функциональных субъединиц: S1 (содержащая RBD-домен) обеспечивает связывание с рецептором клетки-мишени (ACE2), S2 способствует слиянию вируса и клеточной мембраны. Антитела к RBD могут блокировать связывание с рецептором ACE2, препятствуя проникновению и размножению SARS-CoV-2 в организме.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

Метод определения основан на непрямом двухстадийном иммуноферментном анализе. В лунках полистиролового планшета иммобилизован рекомбинантный антиген с последовательностью RBD spike-белка SARS-CoV-2. При наличии в исследуемых образцах специфических антител класса G к RBD spike-белка SARS-CoV-2 образуется иммунный комплекс антиген-антитело (стадия 1), который детектируется конъюгатом – антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (стадия 2).

При добавлении ТМБ-Субстратного раствора в лунки планшета происходит окрашивание раствора в синий цвет. Реакцию останавливают добавлением в раствор стоп-реагента. При этом синий цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител к RBD spike-белка SARS-CoV-2 в образце. Учет результатов можно проводить при длине волны 450/620-680 нм или 405/620-680 нм. Допустимо измерять ОП при 450 нм или 405 нм.

Затем на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация антител класса G к RBD spike-белка SARS-CoV-2 в БАУ/мл в исследуемых образцах.

Калибраторы аттестованы по международному стандарту “First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)”, NIBSC code: 20/136. Учитывая, что NIBSC code: 20/136 аттестован и в БАУ/мл и в МЕ/мл, концентрацию антител класса G, в том числе потенциально обладающих вируснейтрализующим действием, к RBD spike-белка SARS-CoV-2 можно выражать в БАУ/мл и в МЕ/мл.

БАУ/мл (binding antibody units in ml) - единицы связывающих антител, установленные в качестве единиц измерения в “First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)”, NIBSC code: 20/136. БАУ/мл используют для сравнения результатов определения одного и того же класса антител с одинаковой специфичностью (анти-RBD IgG).

МЕ/мл – международные единицы, установленные в качестве единиц измерения в “First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)”, NIBSC code: 20/136, для определения концентрации вируснейтрализующих антител.

III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Характеристики реагентов		Форма выпуска  96
Иммуносорбент	Планшет полистироловый 96-луночный разборный до стрипов (или до лунок), в лунках которого сорбирован рекомбинантный антиген с последовательностью RBD spike-белка SARS-CoV-2. Готов к применению.	1 планшет
Конъюгат	Антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена. Готов к применению. Прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость. Содержит 0,10% ProClin 300*.	1 фл. 12,0 мл
Калибратор 0	Калибратор 0, не содержащий антитела класса G к SARS-CoV-2. Готов к применению. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 фл. 1,2 мл
Калибратор 1	Калибратор 1, содержащий антитела класса G к SARS-CoV-2 в концентрации 10 BAU/мл (МЕ/мл)**, инактивированный. Готов к применению. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 фл. 1,2 мл
Калибратор 2	Калибратор 2, содержащий антитела класса G к SARS-CoV-2 в концентрации 100 BAU/мл (МЕ/мл)**, инактивированный. Готов к применению. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 фл. 1,2 мл
Калибратор 3	Калибратор 3, содержащий антитела класса G к SARS-CoV-2 в концентрации 400 BAU/мл (МЕ/мл)**, инактивированный. Готов к применению. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 фл. 1,2 мл
БР	Блок-раствор для разведения сывороток. Готов к применению. Прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость, допустимо образование осадка.	1 фл. 12,5 мл
PPC	Раствор для предварительного разведения сывороток. Готов к применению. Прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетово-синего цвета жидкость.	1 фл. 12,5 мл
ПР	Промывочный раствор. Концентрат (×25) фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °C и встряхивании.	1 фл. 50,0 мл
Стоп-реагент	Раствор серной кислоты (0,2М)*. Готов к применению. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 фл. 25,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор	Готов к применению. Прозрачная бесцветная жидкость, возможно наличие окраски.	1 фл. 14,0 мл
Планшет для предварительного разведения сывороток	Планшет полистироловый с бесцветными лунками.	1 планшет
Плётка защитная для ИФА-планшетов		2 шт.
Наконечники одноразовые		16 шт.
Ванночка пластиковая для жидких реагентов		2 шт.
Пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock		1 шт.
Бланк для построения калибровочного графика		1 шт.
Инструкция по применению		1 шт.

* Указано содержание вредных веществ в опасных концентрациях для реагентов, обозначенных символом «Внимание».

** Калибраторы аттестованы относительно "First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)", NIBSC code: 20/136 в ВАУ/мл (для связывающих антител) и в МЕ/мл (для антител с вируснейтрализующим действием). Значения концентраций антител класса G к SARS-CoV-2 в Калибраторах указаны на этикетках флаконов и в паспорте на серию набора реагентов.

Примечание: по запросу потребителя может быть предоставлена Контрольная сыворотка.

Набор комплектуется готовыми реагентами и концентрированными растворами. Имеется маркировка посредством штрих-кодов.

Набор реагентов упакован в потребительскую упаковку (коробку картонную). Паспорт на серию входит в комплект сопроводительной документации на продукцию.

IV. ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

4.1. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека

Оценка эквивалентности образцов сыворотки и плазмы крови человека проведена в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».

Исследование положительных (n=25) и отрицательных (n=25) на анти-RBD IgG парных образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащей различные антикоагулянты (ЭДТА, гепарин, цитрат натрия), была показана их эквивалентность, что позволяет отнести показатели диагностической чувствительности и специфичности к обоим видам исследуемых образцов.

4.2. Воспроизводимость и повторяемость

Исследование воспроизводимости проведено в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».

Коэффициент вариации тестирования положительных образцов внутри планшета (повторяемость), между планшетами одной серии и между сериями набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» не превышает 8%.

4.3. Аналитическая чувствительность и пределы измерения

Исследование аналитической чувствительности проведено в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».

Аналитическая чувствительность не превышает 0,5 ВАУ/мл.

Исследование пределов измерения проведено в соответствии с CLSI EP17-A2 Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures

- LoB (предел холостой пробы) – 0,8 ВАУ/мл;
- LoD (предел обнаружения) – 1,7 ВАУ/мл;
- LoQ (предел измерения) – 4,17 ВАУ/мл.

4.4. Диапазон измерения

Интервал измерения находится в пределах 4,17 ВАУ/мл – 400 ВАУ/мл.

4.5. Линейность

Исследование линейности проведено в соответствии с CLSI EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach

Линейный диапазон от 3 ВАУ/мл до 400 ВАУ/мл.

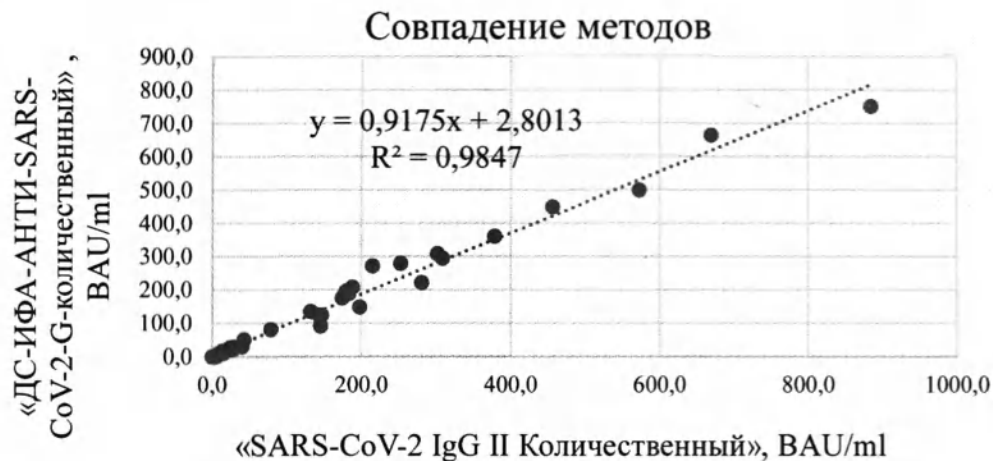
4.6. Открытие

Исследование открытия проведено в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».

Значение «открытия» находится в пределах от 90% до 110%.

4.7. Сравнение методов

– Было проведено сравнение «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» с «Набором реагентов для качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2 иммунохемилюминесцентным методом в сыворотке и плазме крови человека на иммунохимических анализаторах ARCHITECT «SARS-CoV-2 IgG II Количественный Реагенты для ARCHITECT (SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit)», «Эбботт Ирландия Диагностическое подразделение», Ирландия. Коэффициент детерминации составил 0,9847, наклон составил 0,9175. Качественное совпадение с тестом сравнения составило 100,00% (95% CI: 93,24-100,00%).



– Совпадение с тестом сравнения для полуколичественного определения антител класса G к RBD spike-белка SARS-CoV-2 составило 100% (95%CI: 97,66-100%).

4.8. Правильность

Исследована правильность измерения на 25 образцах с известной концентрацией антител к SARS-CoV-2 из диапазона измерения 4,17 BAU/мл – 400 BAU/мл, приготовленных путем добавления "First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)", NIBSC code: 20/136 в негативные образцы. Смещение измеряемого для каждого образца с известной концентрацией антител к SARS-CoV-2 находится в пределах $\pm 10\%$.

4.9. Аналитическая специфичность

• Влияние интерферирующих веществ

– Влияние потенциально интерферирующих веществ оценено при исследовании 55 образцов сыворотки/плазмы крови человека, содержащих различные концентрации интерферирующих веществ из коммерческих панелей "Panel of interfering Substances" и "Analytical Specificity Panel for SARS-CoV-2", Invent Diagnostica GMBH, Германия.

Определено, что беременность, наличие в образцах сыворотки крови антител к *Escherichia coli*, НАМА, а также ревматоидного фактора до 77,4 Ед/мл, образцов с липидемией, содержащих до 204 мг/дл (2,04 мг/мл) холестерина, не влияет на специфичность «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный».

– Определено, что наличие в образцах сыворотки крови гемоглобина в концентрации до 100 мг/дл, билирубина до 60 мг/дл, триглицеридов до 2000 мг/дл не влияет на эффективность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный».

• Перекрестная реактивность

– Не обнаружено перекрестной реактивности при исследовании 109 образцов сыворотки крови человека, содержащих антитела к возбудителям инфекционных заболеваний: Coronavirus 229E (0/12), Coronavirus OC43 (0/11), Coronavirus HKU1 (0/18), Coronavirus NL63 (0/5), Influenza A (0/7), Influenza B (0/6), Respiratory syncytial virus (0/5), Haemophilus influenzae (0/5), HBV (0/5), HCV (0/5), HIV-1,2 (0/5), EBV (0/5), Chlamydia pneumoniae (0/5), Mycoplasma pneumoniae (0/5), CMV (0/5), HSV-1,2 (0/5).

4.10. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» при тестировании образцов "AccuSet™ SARS-CoV-2 Performance Panel", SeraCare (n=11), США, и "First WHO Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin", NIBSC code: 20/268 (n=5), Великобритания, составила 100%.

• Образцы сыворотки крови от пациентов с подтвержденным COVID-19

Для определения диагностической чувствительности были исследованы 44 клинических образца сыворотки крови пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 (положительные результаты ПЦР-тестирования и КТ грудной клетки). Все образцы были отобраны не ранее чем через две с половиной недели от начала появления симптомов заболевания. Диагностическая чувствительность набора реагентов составила 100% (95% CI: 91,97%-100,0%).

Была оценена частота выявления антител в разные сроки развития заболевания, исследованы 215 образцов сыворотки крови от 152 пациентов с подтвержденным клиническим и лабораторным диагнозом COVID-19 (Таблица 1).

Таблица 1

Распределение результатов серологического тестирования в группе пациентов с клиническим и лабораторным диагнозом COVID-19

№	Группа	Количество образцов	% положительных результатов	Ожидаемый уровень сероконверсии*, %
1	0-7 дней от появления первых симптомов	96	42,7	3,6-50,0
2	8-14 дней	62	79,0	48,7- 97,4
3	15-47 дней	57	100,0	ND

* данные приведены из обзора Flodgren GM, Immunity after SARS-CoV-2 infection. Rapid review 2020. Oslo: Norwegian Institute of Public Health, 2020.

• Образцы сыворотки крови от пациентов в реконвалесцентном периоде COVID-19 и после выздоровления

Протестировано 159 образцов сыворотки крови от 55 пациентов с клиническим и лабораторным диагнозом COVID-19, полученных в реконвалесцентный период заболевания и после выздоровления (59-89 день после возникновения симптомов). Процент положительных результатов составил 100,00% (95% CI: 97,64% - 100,00%).

• Образцы сыворотки крови от вакцинированных пациентов

Протестировано 55 образцов сыворотки крови от пациентов, вакцинированных препаратом «Гам-КОВИД-Вак» (торговое название «Спутник V»). Образцы сыворотки крови были забраны после первой дозы вакцины, через месяц после второй дозы и через два месяца после второй дозы. Процент положительных результатов составил 100,00% (95% CI: 93,47% - 100,00%).

4.11. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» была оценена при исследовании:

- 352 образцов сыворотки крови случайной выборки доноров, забранных до ноября 2019 года. Специфичность составила 100,00% (95% CI: 98,92% - 100,00%);
- 90 образцов сыворотки крови госпитальных пациентов с неинфекционными заболеваниями, забранных до ноября 2019 года. Специфичность составила 100,00% (95% CI: 95,91% - 100,00%);
- 109 образцов сыворотки крови пациентов, забранных до ноября 2019 года, содержащих антитела к возбудителям инфекционных заболеваний: Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus HKU1, Coronavirus NL63, Influenza A, Influenza B, Respiratory syncytial virus, Haemophilus influenzae, HBV, HCV, HIV-1,2, EBV, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, CMV, HSV-1,2. Диагностическая специфичность составила 100,0% (95% CI: 96,60% - 100,00%);

Общая диагностическая специфичность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» составила 100,0% (95% CI: 99,31%-100,00%).

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 5.1. Нестерильное медицинское изделие для диагностики *in vitro*. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 г. N 4н).
- 5.2. Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности».
- 5.3. Реагенты набора не горючие. Внешняя упаковка не является самовоспламеняемой, взрывоопасной.
- 5.4. Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При использовании по назначению вероятность негативного воздействия на организм человека незначительна. Растворы в представленных объемах и концентрациях не опасны при вдыхании.

Меры первой помощи (при необходимости): При попадании на кожу/в глаза – промыть большим количеством воды. Загрязненную одежду снять. При необходимости обратиться за медицинской помощью.

- 5.5. Материал человеческого происхождения, использованный для приготовления реагентов набора, не содержит HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2 и HCV.
- 5.6. Все реагенты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.
- 5.7. При работе с реагентами набора (Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- 5.8. Отдельные реагенты набора приготовлены с использованием биологического материала животного происхождения.
- 5.9. Паспорт безопасности для набора реагентов может быть представлен по запросу клиента.
- 5.10. Для получения надежных результатов необходимо:
 - обеспечить установленные условия хранения набора;
 - строго соблюдать требования Инструкции по применению набора реагентов.
- 5.11. Не использовать МИ:
 - при повреждении целостности упаковки реагентов;
 - при несоответствии внешнего вида реагентов (см. п. III Состав набора реагентов);
 - при повреждении маркировки.

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

- 6.1. Изделия в процессе хранения и транспортирования не выделяют вредных веществ, загрязняющих окружающую среду. Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов по назначению, установленному производителем, а также не использованные изделия (истекший срок годности, поврежденная потребительская упаковка/маркировка, поврежденная упаковка/маркировка реагентов и т.д.) относятся к медицинским отходам класса «А», «Б» и «Г» в соответствии со ст. 49 Федерального закона от 21.11.2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
- 6.2. Медицинские отходы подлежат сбору, обезвреживанию, размещению, хранению, транспортировке, учету и утилизации в соответствии с действующими правилами и нормативами (СанПиН 2.1.3684-21, СанПиН 3.3686-21, МУ 287-113).

VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная (деионизированная);
- Дозаторы пипеточные переменного объема для отбора жидкостей;
- Наконечники одноразовые для дозаторов пипеточных;
- Инкубатор микропланшетный (термостат) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Планшетный спектрофотометр (ИФА-ридер) с фильтрами 450 нм, 405 нм и 620-680 нм;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Средства измерения времени (часы, таймер);
- ИФА-анализатор открытого типа с фильтрами 450 нм, 405 нм и 620-680 нм (для постановки ИФА в автоматическом режиме).

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови человека проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать только нативные (неразведенные) образцы сыворотки крови человека или плазмы крови человека с различными антикоагулянтами (ЭДТА, гепарин, цитрат натрия).

При использовании плазмы с жидким антикоагулянтом (цитрат натрия) полученное значение концентрации необходимо умножить на фактор разведения.

Фактор разведения = (Объем антикоагулянта в пробирке + Общий объем крови в пробирке) / Общий объем крови в пробирке.

Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, осветлять центрифугированием.

Для исследования могут быть использованы образцы сыворотки/плазмы крови человека, прошедшие термоинактивацию в течение 30 минут при 56 °С.

Образцы с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным ростом анализу не подлежат!

Образцы хранить/транспортировать в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Допустимо двукратное замораживание/оттаивание образцов.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

9.1. Общие требования и рекомендации:

- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - **ПР**, который взаимозаменяем во всех наборах реагентов производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - **Стоп-реагента**, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора;
 - другие реагенты также могут быть взаимозаменяемыми для постановки в большинстве наборов реагентов ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7626, 7655) или по E-mail: info@npods.ru; help-ds@npods.ru.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение. Использовать одноразовую или химически чистую лабораторную посуду для приготовления реагентов. Не допускать контакта металлических предметов с реагентами.
- Каждая лунка Иммуносорбента предназначена для однократного использования.
- Не подвергать реагенты и рабочие растворы воздействию высоких температур или прямого солнечного света.
- Перед использованием флаконы с жидкими реагентами перемешать, не допуская вспенивания.

9.2. Реагенты, готовые к использованию:

• **Иммуносорбент.** Планшет, состоящий из 12 стрипов и рамки, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1 см от края пакета, и взять необходимое количество стрипов.

- Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Конъюгат, БР, РРС, ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент (0,2М).

9.3. Реагенты, требующие предварительного приготовления:

- **Рабочий ПР:** Необходимый объем концентрата ПР ($\times 25$) развести в 25 раз соответствующим объемом воды дистиллированной (деионизированной) (см. Таблицу 1) и тщательно перемешать.

Таблица 1

Расход ПР в зависимости от количества используемых стрипов

Количество используемых стрипов		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Рабочий ПР	ПР ($\times 25$), мл	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	21,0	24,0	27,0	30,0	33,0	40,0
	Вода, мл	72,0	144,0	216,0	288,0	360,0	432,0	504,0	576,0	648,0	720,0	792,0	960,0

X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Общие требования и рекомендации:

- Использовать валидированные дозаторы и оборудование.
- Использовать новый наконечник для каждого образца.
- Перед использованием набор реагентов выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре.
- Перед использованием ванночки пластиковые для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной).
- Не использовать одну и ту же ванночку пластиковую для внесения Конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.
- Избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы.
- Не допускать высыхания лунок Иммуносорбента между отдельными операциями.

- Соблюдать требования к промывке (рекомендованное количество циклов, объём раствора при наполнении, временные интервалы, эффективность отсасывания).
- Плёнки защитные для ИФА-планшетов являются одноразовыми и повторному использованию после снятия не подлежат.

10.2. Проведение ИФА:

Этап	Процедура постановки
1	В лунки планшета для предварительного разведения сывороток внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешивая пипетированием. При этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зелёный.
2	Внести в лунки Иммуносорбента по 100 мкл Калибраторов: <i>Для полуколичественного определения:</i> в 1 лунку Калибратор 0, в 2 лунки Калибратор 1, в 1 лунку Калибратор 3. <i>Для количественного определения:</i> в 2 лунки Калибратор 0, в 2 лунки Калибратор 1, в 2 лунки Калибратор 2, в 2 лунки Калибратор 3.
3	В остальные лунки Иммуносорбента внести по 90 мкл БР и по 10 мкл предварительно разведённых исследуемых образцов (конечное разведение исследуемых образцов 1:100), тщательно перемешивая пипетированием.
4	Планшет накрыть защитной плёнкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.
5	С помощью промывочного устройства удалить содержимое лунок в ёмкость с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 4 раза рабочим раствором ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета до краёв (не менее 350 мкл в лунку), затем удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором. При необходимости удалить остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. <i>Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.</i>
6	Во все лунки планшета внести по 100 мкл Конъюгата.
7	Планшет накрыть защитной плёнкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.
8	С помощью промывочного устройства удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим ПР, как описано в п 5.
9	Во все лунки планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора.
10	Планшет выдержать 20 мин в защищённом от света месте при комнатной температуре: $(18-25) ^\circ\text{C}$.
11	Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл Стоп-реагента, встряхнуть стрипы в течение 5-10 секунд и провести учет результатов при длине волны 450/620-680 нм или 405/620-680 нм. Допустимо измерять ОП при 450 нм или 405 нм. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин. <i>При отсутствии фильтра 405 нм, измерение результатов анализа проводить при длине волны 450 нм.</i>

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

По вопросам постановки на автоматических ИФА-анализаторах открытого типа обращаться в адрес производителя набора реагентов.

II. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакцию учитывать, если при всех рекомендуемых режимах измерения среднее значение оптической плотности (ОП_{ср.}) в лунках с Калибратором 0 – не более 0,150, с Калибратором 3 – не менее 0,600.

II.1. Полуколичественное определение антител класса G к RBD spike-белка SARS-CoV-2

Рассчитать ОП_{крит.} по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \frac{\text{ОП}_{\text{сред. Калибратора 1}}}{2}$$

где ОПсред. Калибратора 1 – среднее значение оптической плотности Калибратора 1.

Использование коэффициента позитивности позволяет проводить сравнительный анализ уровня специфических антител в парных образцах сыворотки крови и отслеживать динамику изменения уровня IgG к SARS-CoV-2.

Коэффициент позитивности (КП) рассчитывается как отношение ОП исследуемого образца к ОПкрит. по формуле:

$$\text{КП} = \text{ОП} / \text{ОПкрит.}$$

Интерпретация результатов:

Исследуемые образцы расценивать как положительные: если $\text{КП} \geq 1,0$.

Исследуемые образцы расценивать как отрицательные: если $\text{КП} < 1,0$.

11.2. Количественное определение антител класса G к RBD spike-белка SARS-CoV-2

По результатам измерений вычислить средние арифметические значения ОП для дубликатов Калибраторов. В линейных координатах построить калибровочный график: ось абсцисс X – концентрация антител (BAU/мл), ось ординат Y – значения средней ОП Калибраторов. Для построения графика при учете при 450/620-680 нм использовать ОП Калибраторов 0-2. Для построения графика при учете при 405/620-680 нм использовать ОП калибраторов 0-3.

По калибровочному графику определить концентрацию антител в исследуемых образцах.

Если ОП исследуемого образца, измеренная при 450/620-680 нм, выше, чем ОП Калибратора 2, выдается результат: «больше 100 BAU/мл», или этот образец должен быть протестирован в большем разведении.

Если ОП исследуемого образца, измеренная при 405/620-680 нм, выше, чем ОП Калибратора 3, выдается результат: «больше 400 BAU/мл», или этот образец должен быть протестирован в большем разведении.

Для дополнительного разведения образца использовать РРС и полученную концентрацию антител умножить на фактор разведения.

Возможно определение уровня вируснейтрализующих антител, используя указанный выше калибровочный график. Результаты выражать в МЕ/мл.

Методы математической обработки результатов.

При учете результатов с помощью встроенного или внешнего программного обеспечения спектрофотометра рекомендуется использовать следующие методы математической обработки результатов:

Марка спектрофотометра	Рекомендуемые методы математической обработки
Statfax 2100, 3200	Point-to-point
Tecan Sunrise	Point-to-point
Bio-Rad 680, iMark	4 PL-Cook-Wilkenson, Point-to-point
Multiscan EX, FC	Point-to-point

Интерпретация результатов:

Исследуемые образцы расценивать как положительные:

если концентрация антител ≥ 5 BAU/мл (МЕ/мл).

Исследуемые образцы расценивать как отрицательные:

если концентрация антител < 5 BAU/мл (МЕ/мл).

III. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

• Результаты, полученные в этом или любом другом диагностическом тесте, должны быть использованы и интерпретированы только в контексте всей клинической картины.

• Диагностика инфекции COVID-19 возможна только при наличии клинических проявлений и комплекса лабораторных исследований (выявление увеличения уровня антител к SARS-CoV-2, положительный результат ПЦР).

• Отрицательный результат теста не исключает возможности наличия коронавирусной инфекции COVID-19, т.к. забор крови может быть осуществлен в период серонегативного окна.

• Положительные результаты могут быть связаны с прошлой или настоящей инфекцией коронавирусами не-SARS-CoV-2.

• При иммунодефицитных состояниях может наблюдаться задержка образования антител к SARS-CoV-2.

• Согласно инструкции по применению "First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)", NIBSC code: 20/136, при сравнении результатов тестирования одного и того же образца, выраженных в БАУ/мл, необходимо учитывать класс антител и их специфичность (например, анти-RBD IgG, анти-spike IgG, анти-N IgM и др.). Результаты одного и того же образца, протестированного в тест-системах разных производителей, могут различаться. Это связано с разнообразием используемого сырья и/или формата теста.

III. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

3.1	Срок годности набора реагентов 12 месяцев. Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.			
3.2	Условия хранения набора реагентов Хранить наборы при температуре от 2 до 8 °С в сухом, защищенном от света месте с использованием оборудования и помещений, обеспечивающих заданные условия, в соответствии с установленными правилами. Замораживание не допускается. Наборы, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, использованию не подлежат.			
3.3	Условия транспортирования набора реагентов Транспортировать наборы следует крытым транспортом, с соблюдением температурного режима, установленного изготовителем, в соответствии с установленными правилами перевозок. Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, использованию не подлежат. Наборы реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование: при температуре от 9 до 25 °С			не более 10 сут
3.4	Условия и сроки хранения рабочих растворов (хранить в чистых флаконах в защищённом от света месте)			
	Рабочий ПР	при температуре от 2 до 8 °С	не более 28 сут	
		при температуре от 18 до 25 °С	не более 14 сут	
3.5	Условия и сроки хранения неиспользованных реагентов набора после вскрытия Хранить в сухом, защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.			
	Иммуносорбент	После вскрытия неиспользованные стрипы без рамки поместить в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock.	в течение срока годности набора реагентов*	
	БР, РРС, ПР, Стоп-реагент	Флаконы плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя	в течение срока годности набора реагентов*	
	Конъюгат, Калибраторы, ТМБ-Субстратный раствор	Флаконы плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя. Необходимо отбирать в ванночку требуемое для проведения анализа количество Конъюгата или ТМБ-Субстратного раствора. Остатки реагента из ванночки не сливать во флакон.	в течение 2 месяцев	

* Не верифицировано данными исследования в реальном времени. На момент подачи документов на регистрацию данными в реальном времени подтвержден срок годности 4 месяца.

IV. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И РЕМОНТ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

XV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Производитель (изготовитель): Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» (ООО «НПО «Диагностические системы»), 603157, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Коминтерна, 47. Почтовый адрес: 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемого продукта требованиям нормативной и технической документации.
Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего установленного срока годности.
- Гарантии производителя не распространяются при нарушении условий хранения и транспортирования, а также в случае несоблюдения инструкции по применению.
- Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес производителя:

ООО «НПО «Диагностические системы»

603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22

Тел./факс: (831) 434-86-83, 8-800-555-0300

E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

- 1) рекламационного набора;
- 2) всех образцов кроводач пациента;
- 3) протоколов исследований с использованием других тест-систем с указанием производителя, серии, сроков годности.

XVI. ОБЪЯСНЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СИМВОЛОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу		Предел температуры
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов (количество определений)		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии (номер серии)		Беречь от влаги
	Дата изготовления (YYYY-MM)		Внимание
	Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD)		Верх
	Не использовать при повреждении упаковки		Хрупкое, обращаться осторожно

Директор по производству

ООО «НПО «Диагностические системы», к.б.н.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В.К. Паменов

Краткая схема (допускается использование как формы записи)

REF:	Серия:
Годен до:	Дата проведения:

Этапы проведения анализа		Отметка о выполнении
Выдержать набор реагентов		не менее 30 мин, (18-25) °C
Приготовить Рабочий ИР		1 часть ИР (x25) + 24 части H ₂ O
Манипуляции на планшете для предварительного разведения сывороток		
Внести РРС, Исследуемые образцы		Внести в лунки планшета по 90 мкл по 10 мкл
Внести Калибраторы		в лунки Иммуносорбента по 100 мкл: или по количеству имеющегося определения: • 1 лунку - Калибратор 0, в 1 лунку - Калибратор 1, • 1 лунку - Калибратор 3. для количественного определения: • 2 лунки - Калибратор 0, в 2 лунки - Калибратор 1, • 2 лунки - Калибратор 3, в 2 лунки - Калибратор 3.
Внести ИР Предварительно разведенные исследуемые образцы		в остальные лунки Иммуносорбента: по 90 мкл по 10 мкл
Инкубировать		накрыть пленкой, (37,0±1,0) °C, 30 мин
Промыть Рабочим ИР		по 350 мкл 4 раза в каждую лунку
Внести Конъюгат		по 100 мкл в каждую лунку
Инкубировать		накрыть пленкой, (37,0±1,0) °C, 30 мин
Промыть Рабочим ИР		по 350 мкл 4 раза в каждую лунку
Внести ТМБ-Субстратный раствор		по 100 мкл в каждую лунку
Инкубировать		(18-25) °C, в темноте, 20 мин
Внести Стоп-реагент		по 150 мкл в каждую лунку
Измерить ОП		при 450/620-680 нм или 450 нм, или при 405/620-680 нм или 405 нм
Полуколичественное определение:		Количественное определение:
Рассчитать ОП крит., КИ		Построить график f-X(Y)
Провести оценку результатов		☐

Выполнил (ФИО)		(подпись)
Проверил (ФИО)		(подпись)

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью

15 (А.М.Михайлов) листов(а)
цифрами подписью

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, д.м.н.

Блатошарова А.С.

личная подпись



Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью

15 (А.М.Михайлов) листов(а)
цифрами подписью

Заместитель генерального директора

Шпондин О.Н.

личная подпись

