

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБХ РАН,
академик



А.Г. Габибов

января 2022 года

ИНСТРУКЦИЯ по применению

«Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» по ТУ 21.20.23-053-02699487-2022 серия 053-04, дата выпуска 17.01.2022, количество наборов в серии: 5000 штук

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Назначение.

«Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» по ТУ 21.20.23-053-02699487-2022 серия 053-04, дата выпуска 17.01.2022, количество наборов в серии: 5000 штук (далее по тексту – Набор реагентов) предназначен для количественного определения активности нейтрализующих антител к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S коронавируса *SARS-CoV-2* в сыворотке или плазме крови человека, приготовленной путем добавления одного из антикоагулянтов - Li-гепарин, ЭДТА-КЗ, цитрат натрия - (далее по тексту – Плазма), методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Функциональное назначение: для оценки иммунного ответа на перенесенную новую коронавирусную инфекцию COVID-19; для оценки иммунного ответа у привитых вакцинами для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19.

1.2. Диагностическая роль набора реагентов.

Набор реагентов в клинической лабораторной практике рекомендуется использовать:

- для количественного иммуноферментного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в сыворотке или плазме крови у переболевших COVID-19, в том числе с целью установления необходимости вакцинации, выдачи (или отказа в выдаче) сертификата COVID-19 (QR-кода);

- для количественного иммуноферментного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в сыворотке или плазме крови у привитых вакцинами для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19, в том числе с целью установления необходимости ревакцинации, выдачи (или отказа в выдаче) сертификата COVID-19 (QR-кода);

- для мониторинга эффективности вакцинации (ревакцинации) населения и исследования популяционного иммунитета к *SARS-CoV-2*;

- для отбора потенциальных доноров иммунной плазмы с нейтрализующими антителами к *SARS-CoV-2*.

1.3. Показания и противопоказания к применению набора реагентов.

Только для профессионального использования. Противопоказаний и побочных эффектов при работе с набором реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» не выявлено. Набор реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» предназначен только для однократного применения по назначению.

1.4. Область применения.

Клиническая лабораторная диагностика. Только для диагностики *in vitro*.

1.5. Сокращенное наименование набора.

«SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН».

1.6. Предназначенный пользователь набора реагентов.

Персонал клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений, имеющих лицензию на вид медицинской деятельности - клиническая лабораторная диагностика. Специалисты с высшим медицинским 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.

1.7. Условия эксплуатации.

Анализы проводятся в условиях медицинских и клинико-диагностических лабораторий (ГОСТ Р 53079.2-2008).

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

2.1. Принцип действия.

Метод количественного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* основан на использовании конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа взаимодействия рекомбинантного рецептор-связывающего домена (далее по тексту – RBD) поверхностного гликопротеина S коронавируса *SARS-CoV-2* с рекомбинантным человеческим рецептором ACE2 (далее по тексту - рецептор ACE2 или ACE2).

На первой стадии происходит взаимодействие нейтрализующих антител к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S коронавируса *SARS-CoV-2* (при их наличии в исследуемом образце) с RBD, сорбированным на поверхности лунок разборного полистиролового планшета.

На второй стадии происходит взаимодействие RBD с рекомбинантным человеческим рецептором ACE2. Если исследуемый образец не содержит нейтрализующие антитела к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S коронавируса *SARS-CoV-2*, то происходит образование комплекса «RBD-ACE2». Если исследуемый образец содержит нейтрализующие антитела, то комплекс «RBD-ACE2» образуется частично или не образуется.

На третьей стадии образовавшийся комплекс «RBD-ACE2» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Визуализация результата происходит при добавлении к комплексу «RBD-ACE2-конъюгат» рабочего раствора хромогена. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при двух длинах волн: основной 450 нм и референс-фильтр 620-700 нм, которая обратно пропорциональна активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в исследуемых образцах сыворотки или плазмы крови.

Количественное определение активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* выражается в IU/мл - международных единицах активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2*, относительно стандарта «First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)», NIBSC code: 20/136 – первый международный стандарт ВОЗ (далее по тексту – стандарт ВОЗ).

2.2. Состав набора реагентов:

	Наименование компонента (сокращение)	Количество
1.	Иммуносорбент	2 шт.
2.	Отрицательный контроль (К-)	1 фл. 3 мл
3.	Положительный контроль (К+) *	1 фл. 3 мл
4.	Раствор для промежуточного разведения образцов (РПРО)	1 фл. 30мл
5.	Раствор для разведения образцов (РРО)	1 фл. 25 мл
6.	Раствор для разведения рецептора ACE2 (РРА)	1 фл. 25 мл
7.	Концентрат рецептора ACE2 (ACE2 (x11))	1 фл. 2,5 мл
8.	Концентрат конъюгата (Кг (x11))	1 фл. 2,5 мл
9.	Раствор для разведения конъюгата (РРК)	1 фл. 25 мл
10.	ТМБ-хромоген	1 фл. 25 мл
11.	Концентрат промывочного раствора, 25-кратный (КПР(x25))	1 фл. 50 мл
12.	Стоп-реагент	1 фл. 25 мл
13.	Пленка для заклеивания иммуносорбента	8 шт.
14.	Одноразовые ванночки для реагентов	8 шт.
15.	Одноразовые сменные наконечники к дозаторам пипеточным (10-300 мкл)	64 шт.
16.	Планшет для разведения образцов	2 шт.
17.	Калибровочный график	1 шт.
18.	Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.

* Положительный контроль аттестован относительно стандарта ВОЗ.

Набор реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» выпускается в одном варианте исполнения и рассчитан на проведение 192 определений, включая контрольные.

Набор реагентов предназначен для ручной постановки и для постановки на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа с возможностью как дробного использования планшета (набора), так и использования для постановки целого планшета (набора).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Аналитическая чувствительность.

Аналитическая чувствительность и нижний предел количественного определения набора реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» составляют 4 IU/мл (диапазон неопределенности измерений составляет 2-6 IU/мл).

3.2. Интервалы измерений.

Интервал количественного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* - от 4 до 60 IU/мл. Диапазон неопределенности измерений для нижнего предела количественного определения - от 2 до 6 IU/мл, для верхнего предела количественного определения – от 55 до 65 IU/мл. Интервал количественного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2*, с учетом фактора разведения анализируемых образцов (x50) - от 200 IU/мл до 3000 IU/мл.

3.3. Тест на «линейность».

Тест на «линейность» - в диапазоне 90-110%.

3.4. Тест на «открытие».

Тест на «открытие» – в диапазоне 90-110%.

3.5. Аналитическая специфичность.

Перекрестная реактивность оценивалась по результатам испытаний образцов сыворотки (плазмы) крови, от невакцинированных и не болевших COVID-19 пациентов, которые содержат соответствующие маркеры к патогенам: другие типы коронавируса, *HBV*, *HCV*, *HIV-1*, *HIV-2*, *Adenovirus*, *Human Metapneumovirus (hMPV)*, *Parainfluenza virus 1-4*, *Influenza A*, *Influenza B*, *Enterovirus 71*, *Respiratory syncytial virus*, *Rhinovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, Эпштейн-Барр вирус. При проведении испытаний ложноположительные результаты отсутствуют.

3.6. Правильность.

Общая систематическая погрешность измерения набором реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» не превышает 5%.

3.7. Прецизионность.

Прецизионность результатов анализа в условиях повторяемости, с использованием повторов одного и того же образца сыворотки (плазмы) крови, наборами реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» одной серии, не превышает 8%.

Прецизионность результатов анализа в условиях воспроизводимости, с использованием повторов одного и того же образца сыворотки (плазмы) крови, наборами реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» разных серий, не превышает 8%.

3.8. Интерферирующие вещества.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ – гемоглобина (1000 мг/дл), билирубина (60 мг/дл) и триглицеридов (50 мг/дл) - в клинических образцах не влияют на результат анализа.

4. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА.

4.1. Потенциальный риск применения набора реагентов по 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 26.

4.2. Набор реагентов предназначен только для профессионального использования. Лаборатории, выполняющие исследования по определению активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в сыворотке или плазме крови человека, обязаны обеспечивать безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Работу следует проводить в лабораториях, отвечающих требованиям СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». При работе с набором реагентов 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 и утилизировать исследуемые образцы биологического материала в соответствии с санитарными правилами СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- применять набор реагентов строго по назначению;
- допускать к работе с набором реагентов только специально обученный персонал высшим и средним медицинским, биологическим или иным (ветеринарным) образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности и не имеющие

медицинских противопоказаний к вакцинации, лечению специфическими препаратами и к работе в средствах индивидуальной защиты, имеющие навыки работы с молекулярно-биологическими методами диагностики.

4.3. Все компоненты набора реагентов, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания стоп-реагента на кожу и слизистые. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4. Все компоненты, входящие в состав набора реагентов, предназначены для диагностики *in vitro*.

4.5. При работе с набором реагентов необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток, так как образцы сыворотки или плазмы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.

4.6. Нельзя пипетировать растворы ртом.

4.7. Необходимо избегать контакта хромогена и стоп-реагента с кожей и слизистыми оболочками. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.8. Сыворотка (плазма) крови человека, использованная для приготовления отрицательного контроля, не содержит антитела к *SARS-CoV-2* (отсутствие антител подтверждено соответствующим медицинским изделием, зарегистрированным в установленном порядке на территории РФ, - РУ № РЗН 2020/10388), инаktivирована нагреванием, тестирована и определена нереактивной к маркерам гепатита В (*HBsAg*), ВИЧ (антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2), гепатита С (IgG, IgM к ВГС) и возбудителя сифилиса (IgG, IgM к *Treponema pallidum*) (отсутствие маркеров подтверждено соответствующими медицинскими изделиями, зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ, - РУ № ФСР 2012/13925, РУ № ФСР 2012/13835, РУ № РЗН 2015/2352, РУ № РЗН 2017/5931).

4.9. Сыворотка (плазма) крови человека, использованная для приготовления положительного контроля, содержит антитела к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S коронавируса *SARS-CoV-2* (наличие антител подтверждено соответствующим медицинским изделием, зарегистрированным в установленном порядке на территории РФ, - РУ № РЗН 2021/14458 от 28.05.2021), аттестована относительно стандарта ВОЗ, инаktivирована нагреванием, тестирована и определена нереактивной к маркерам гепатита В (*HBsAg*), ВИЧ (антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2), гепатита С (IgG, IgM к ВГС) и возбудителя сифилиса (IgG, IgM к *Treponema pallidum*) (отсутствие маркеров подтверждено соответствующими медицинскими изделиями, зарегистрированными в установленном порядке

на территории РФ, - РУ № ФСР 2012/13925, РУ № ФСР 2012/13835, РУ № РЗН 2015/2352, РУ № РЗН 2017/5931).

4.10. С отрицательным и положительным контролями необходимо обращаться как с потенциально инфекционным материалом.

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

4.12. Все твердые отходы следует собирать в специальный контейнер, обеззараживать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.13. 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.

4.14. Все использованные материалы, инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. УТИЛИЗАЦИЯ.

5.1. Уничтожение и утилизацию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5.2. 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 Б.

5.3. Все твердые отходы, собранные в специальный контейнер, обеззараженные в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», следует утилизировать как отходы класса Б.

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

5.5. Неиспользованный концентрат промывочного раствора 25-кратный (КПР(x25)) следует утилизировать, как отходы класса А.

5.6. Неиспользованные положительный (К+) и отрицательный (К-) контроли, концентрат конъюгата (Кг (x11)), концентрат рецептора ACE2 (ACE2 (x11)), их растворы, раствор для промежуточного разведения образцов (РПРО), раствор для разведения образцов (РРО), раствор для разведения рецептора ACE2 (РРА), раствор для разведения конъюгата (РРК) и иммуносорбент следует обеззараживать и утилизировать, как медицинские отходы класса Б.

5.7. Неиспользованные ТМБ-хромоген и стоп-реагент следует разбавить водой в 100 раз и слить разбавленные растворы в канализацию, а упаковку от этих компонентов утилизировать, как отходы класса А.

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

6. ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ.

6.1. Оборудование:

- термостатируемый шейкер, поддерживающий температуру $+(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- фотометр вертикального сканирования двухволновой, позволяющий проводить измерения оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм и 620-700 нм;
- 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 нему;
- приборы, позволяющие измерять температуру воздуха в диапазоне $+(0-40)^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, относительную влажность $20-90\% \pm 3\%$, атмосферное давление 700-790 мм рт. ст. ± 5 мм рт. ст.

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

6.2. Материалы, реагенты:

- вода дистиллированная;
- спирт этиловый, 70°;
- марлевые салфетки;
- бумага фильтровальная;
- мерный стакан или цилиндр (1000 мл);
- ванночки для реагентов;
- контейнеры для твердых и жидких загрязненных отходов класса Б.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Все работы по отбору проб от больных, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводятся в строгом соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

7.2. Для проведения иммуноферментного анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови. Необходимый объем исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови должен быть не менее 50 мкл.

7.3. Допустимо хранение образцов сыворотки или плазмы крови не более семи суток при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$, или при температуре минус 20°C не более шести месяцев.

7.4. Допустимо замораживание и размораживание образцов не более двух раз.

7.5. Образцы сывороток (плазмы), подвергнутые замораживанию, перед проведением исследования, следует тщательно перемешать.

7.6. Образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты и осадок, следует осветлять с помощью центрифугирования в течение 15 минут при 2500g.

7.7. Во избежание получения ложноположительных результатов образцы сывороток (плазмы) крови следует готовить и хранить в условиях, исключающих бактериальный пророст, а образцы с выраженным гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным заражением рекомендуется не использовать.

7.8. Антикоагулянты (Li-гепарин, ЭДТА-КЗ, цитрат натрия) не влияют на результаты анализа.

8. ПРИЧИНЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К ИСКАЖЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.

8.1. Использование компонентов с истекшим сроком годности.

8.2. Использование компонентов разных серий (кроме унифицированных).

8.3. Использование компонентов из наборов реагентов других производителей.

8.4. Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов в случае дробной постановки анализа.

8.5. Несоблюдение условий забора крови и хранения анализируемых образцов, приводящее к возможному появлению в анализируемом образце веществ, искажающих результат анализа.

8.6. Использование для приготовления растворов для проведения анализа грязной посуды.

8.7. Неправильное дозирование растворов в лунки иммуносорбента, приводящее к искажению значений оптических плотностей, регистрируемых в лунках.

8.8. Использование оборудования, не прошедшего поверки или аттестации в соответствии с установленным графиком.

8.9. Несвоевременное проведение профилактики и дезинфекции устройства для промывки планшетов, приводящее к бактериальному или грибковому проросту в емкости для промывочного раствора, соединительных шлангах устройства и иглах.

8.10. Контакт хромогена и конъюгата с металлическими предметами (ИФА чувствителен к ионам металла).

8.11. Неполное заполнение и опорожнение лунок иммуносорбента во время промывки планшета (см. требования к промывке, п.10.5).

8.12. Несоблюдение времени выдержки между заполнением и опорожнением лунок иммуносорбента (см. требования к промывке, п.10.5).

8.13. Высыхание лунок иммуносорбента между отдельными операциями (см. требования к промывке, п.10.5).

8.14. Использование одних и тех же емкостей для приготовления или хранения разных компонентов и рабочих растворов.

8.15. Использование для работы с компонентами, анализируемыми и контрольными образцами грязных наконечников.

8.16. Использование для дезинфекции посуды, оборудования, материалов и рабочих поверхностей дезинфицирующих средств, оказывающих влияние на результат анализа. Не следует допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора при проведении ИФА.

9. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.

9.1. Компоненты набора реагентов и анализируемые образцы сыворотки или плазмы крови человека должны быть выдержаны не менее 30 минут при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ до начала проведения анализа.

После вскрытия набора реагентов, его компоненты следует хранить при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$.

9.2. Унифицированные неспецифические реагенты.

Взаимозаменяемые реагенты для разных серий набора реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН»:

- концентрат промывочного раствора, 25-кратный (КПР(х25));
- стоп-реагент.

Хранение: неиспользованные концентрат промывочного раствора, 25-кратный (КПР(х25)), стоп-реагент после вскрытия хранить в плотно закрытых флаконах при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора реагентов.

9.3. Подготовка иммуносорбента.

Вскройте пакет и извлеките иммуносорбент из пакета. Установите на рамку планшета необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместите обратно в пакет с влагопоглотителем, герметично закройте и уберите в холодильник.

Хранение: неиспользованные стрипы храните в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора реагентов.

9.4. Приготовление отрицательного контроля (К-), положительного контроля (К+), РПРО, РРО, РРА, РРК, ТМБ-хромогена и стоп-реагента.

Компоненты: отрицательный контроль (К-), положительный контроль (К+), РПРО, РРА, РРО, РРК, ТМБ-хромоген и стоп-реагент готовы к применению. Перед использованием содержимое каждого флакона тщательно перемешайте.

Хранение: неиспользованные отрицательный контроль (К-), положительный контроль (К+), РПРО, РРА, РРО, РРК, ТМБ-хромоген и стоп-реагент после вскрытия храните в плотно закрытых флаконах при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора реагентов.

9.5. Приготовление рабочего разведения промывочного раствора.

Перенесите необходимое количество концентрата промывочного раствора (КПР (х25)) из флакона в мерный стакан и разведите его в 25 раз дистиллированной водой, тщательно перемешайте (см. таблицу № 1).

Хранение: неиспользованный вскрытый концентрат промывочного раствора (КПР(х25)) храните при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности, приготовленный промывочный раствор храните при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ не более 15 дней или при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 30 дней.

9.6. Приготовление рабочего разведения рецептора ACE2.

Отберите необходимый объем концентрата рецептора ACE2 (ACE2(х11)) и разведите его в 11 раз раствором для разведения рецептора ACE2 (PPA) (см. таблицу № 1). Тщательно перемешайте приготовленный раствор рабочего разведения рецептора ACE2, избегая вспенивания.

Хранение: неиспользованный концентрат рецептора ACE2 (ACE2(х11)) храните при

температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора реагентов в плотно закрытом флаконе, приготовленный для использования раствор рецептора ACE2 храните при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ не более 6 часов.

Таблица № 1. Таблица расхода реагентов.

Реагенты	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление промывочного раствора												
КПР(х25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дист. вода, мл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
Приготовление рабочего разведения рецептора ACE2												
ACE2(х11), 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
РРА, мл	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10	11	12
Приготовление рабочего разведения конъюгата												
Кг(х11), 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
РРК, мл	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10	11	12

9.7. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

Отберите необходимый объем концентрата конъюгата (Кг(х11)) и разведите его в 11 раз раствором для разведения конъюгата (РРК) (см. таблицу № 1). Тщательно перемешайте приготовленный раствор рабочего разведения конъюгата, избегая вспенивания.

Хранение: неиспользованный концентрат конъюгата (Кг(х11)) храните при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора реагентов в плотно закрытом флаконе, приготовленный для использования раствор конъюгата храните при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ не более 6 часов.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

10.1. Подготовка разведений анализируемых образцов.

Для получения разведения 1:5 в лунки планшета для разведения образцов внесите по 80 мкл РПРО, в эти же лунки внесите по 20 мкл анализируемых образцов, содержимое лунок перемешайте пипетированием. При внесении образцов цвет РПРО изменяется с фиолетового на синий.

10.2. В лунки иммуносорбента, по предложенной схеме, внесите по 100 мкл отрицательного контроля (К-), положительного контроля (К+):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K-											
B	K-											
C	K+											
D	K+											
E	K+											
F												
G												
H												

10.3. В остальные лунки внесите по 90 мкл раствора для разведения образцов (РРО). В эти же лунки перенесите из планшета для разведения образцов по 10 мкл анализируемых образцов в разведении 1:5, содержимое лунок перемешайте пипетированием.

Строго соблюдайте последовательность внесения реагентов в лунки иммуносорбента!

10.4. Заклейте иммуносорбент пленкой и инкубируйте в термостатирующем шейкере при температуре $+(37 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ и постоянном встряхивании 700-800 об/мин в течение 30 минут.

10.5. По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз.

ВНИМАНИЕ! Промывку иммуносорбента рекомендуется проводить с использованием вошера. В случае отсутствия вошера допускается промывка лунок многоканальной пипеткой.

Требования к качеству промывки:

- полностью отберите жидкость из лунок планшета после инкубации;
- заполните лунки промывочным раствором в объеме не менее 300 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.

10.6. Внесите во все лунки по 100 мкл рабочего разведения рецептора ACE2 (см. п. 9.6). Заклейте иммуносорбент пленкой и инкубируйте в термостатирующем шейкере при температуре

$+(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и постоянном встряхивании 700-800 об/мин в течение 30 минут. По окончании инкубации промойте лунки планшета как указано в п. 10.5.

10.7. Внесите во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (см. п. 9.7). Заклейте иммуносорбент пленкой и инкубируйте в термостатирующей шейкере при температуре $+(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и постоянном встряхивании 700-800 об/мин в течение 30 минут. По окончании инкубации промойте лунки планшета как указано в п. 10.5.

10.8. Внесите во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ-хромогена. Заклейте иммуносорбент пленкой. Поместите иммуносорбент в защищенное от света место и инкубируйте при температуре $+(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут.

10.9. Внесите в лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки цветной реакции.

Не более чем через 15 минут после остановки цветной реакции измерьте на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при двух длинах волн: основной 450 нм и референс-фильтр 620-700 нм. Допускается измерение при одной длине волны с фильтром 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляется по воздуху.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И РАСЧЕТЫ.

11.1. Результаты анализа исследуемых образцов следует учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значения **ОПК-** в лунках с отрицательным контролем (**К-**) должны быть не менее 1,2 оптических единиц;
- значения **ОПК+** в лунках с положительным контролем (**К+**) должны быть в диапазоне от 0,5 до 1,1 оптических единиц.

11.2. Рассчитайте среднее арифметическое значение оптической плотности (**ОПК_{ср.}**) в лунках с положительным (**К+**) контролем.

11.3. Рассчитайте поправочный коэффициент (**ПК**) для анализируемых образцов используя следующую формулу: **ПК = ОПА - ОПК_{ср.}**, где **ОПА** – величина оптической плотности, указанная в аналитическом паспорте; **ОПК_{ср.}** – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с положительным контролем (**К+**).

11.4. Рассчитайте приведенную оптическую плотность анализируемых образцов (**ПОП_{обр.}**), используя следующую формулу: **ПОП_{обр.} = ОП_{обр.} + ПК**, где **ОП_{обр.}** значение оптической плотности анализируемого образца, **ПК** – поправочный коэффициент.

11.5. Для количественного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в исследуемых образцах следует использовать приложенный к набору реагентов калибровочный график.

11.6. Используя значения приведенной оптической плотности анализируемых образцов (**ПОП_{обр.}**) количественно определите, используя калибровочный график, активность

нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в анализируемых образцах. Значение активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* следует умножить на фактор разведения равный 50.

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

12.1. Аналитическая чувствительность и нижний предел количественного определения набора реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» составляют 4 IU/мл (диапазон неопределенности измерений составляет 2-6 IU/мл).

12.2. Интервал количественного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* - от 4 до 60 IU/мл. Диапазон неопределенности измерений для нижнего предела количественного определения - от 2 до 6 IU/мл, для верхнего предела количественного определения – от 55 до 65 IU/мл. Интервал количественного определения активности нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2*, с учетом фактора разведения анализируемых образцов (x50) - от 200 IU/мл до 3000 IU/мл.

12.3. Если в анализируемом образце активность нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* менее 200 IU/мл, то результат анализа образца следует выражать «Активность нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* менее 200 IU/мл».

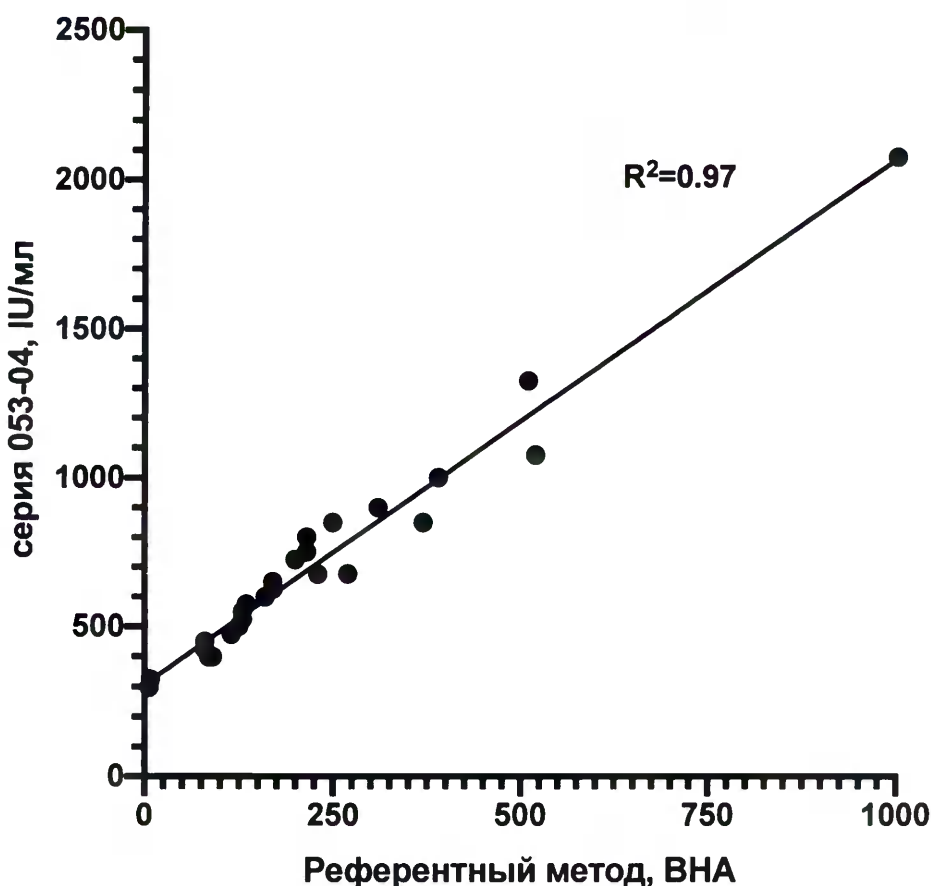
12.4. Если в анализируемом образце активность нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* более 3000 IU/мл, то результат анализа образца следует выражать «Активность нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* более 3000 IU/мл».

12.5. Точка отсечения. Согласно литературным данным (www.theLancet.com vol. 397:671-81; February 2; 2021; [doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)), если в анализируемом образце уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу *SARS-CoV-2* в реакции нейтрализации *in vitro* классическим методом (референтный метод, Н.Н. Гинсбург и др., А. Китакура и др. Стандартизация методов вирусологических исследований. Москва, Медицина. 1974, с. 131-140) составляет величину менее 45 ВНА (разведение 1:45), то этого недостаточно для защиты организма от коронавируса *SARS-CoV-2*. При валидации результатов, полученных с использованием МИ ИВД «Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН», серия 053-04 с помощью референтного метода установлено, что эта величина соответствует 400 IU/мл. Таким образом, если в анализируемом образце активность нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* менее 400 IU/мл, то результат анализа следует выражать «Активность нейтрализующих антител к *SARS-CoV-2* менее 400 IU/мл - недостаточно для защиты организма от коронавируса *SARS-CoV-2*».

13. ВАЛИДАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Валидация результатов, полученных с использованием МИ ИВД «Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН», серия 053-04 проводилась при помощи референтного метода: «Количественное определение уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу SARS-CoV-2 в реакции нейтрализации *in vitro* классическим методом» (Н.Н. Гинсбург и др., А. Китamura и др. Стандартизация методов вирусологических исследований. Москва, Медицина. 1974, с. 131-140).

Получена высокая корреляция ($R^2 = 0.97$) данных определения активности нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, полученных с помощью МИ ИВД «Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН», серия 053-04, с данными, полученными референтным методом.



14. ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИЧЕСКОМУ ОБСЛУЖИВАНИЮ И РЕМОНТУ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ.

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

15. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

15.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$.

15.2. Набор реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 месяцев).

15.3. Допускается хранение и транспортирование при температуре до $+26^{\circ}\text{C}$ в течение семи суток. Замораживание не допускается.

15.4. Набор реагентов применяют согласно инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке.

15.5. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

15.6. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат промывочного раствора (КПР(х25)) и стоп-реагент);
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой;
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку;
- исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования;
- не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении ИФА.

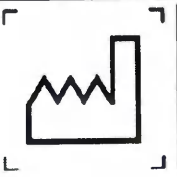
15.7. Срок годности набора – 12 месяцев от даты выпуска (срок годности установлен в соответствии с результатами исследований стабильности набора реагентов методом ускоренного старения).

16. КРАТКАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

	Шаг	Детали
0.	Достать набор из холодильника и приготовить растворы.	Согласно таблице 1 на необходимое количество стрипов: - промывочный раствор - рецептор ACE2 - конъюгат
1.	Приготовление образцов с разведением 1:5	80 мкл РПРО + 20 мкл анализируемого образца
2.	Внесение образцов	2 лунки 100 мкл К- 3 лунки 100 мкл К+ 90 мкл РРО + 10 мкл образца в разведении 1:5
3.	Инкубация с образцами	30 минут 37°C, 700-800 об/мин
4.	Промывка	5 раз по 300 мкл
5.	Внесение рецептора ACE2	100 мкл во все лунки
6.	Инкубация с ACE2	30 минут 37°C, 700-800 об/мин
7.	Промывка	5 раз по 300 мкл
8.	Внесение конъюгата	100 мкл во все лунки
9.	Инкубация с конъюгатом	30 минут 37°C, 700-800 об/мин
10.	Промывка	5 раз по 300 мкл
11.	Внесение ТМБ-хромогена	100 мкл во все лунки
12.	Инкубация (реакция) с ТМБ-хромогеном	15 минут при комн. темп. (20±5)°C в темноте
13.	Остановка реакции	100 мкл стоп-реагента во все лунки
14.	Измерение ОП	В течение 15 мин после остановки реакции.

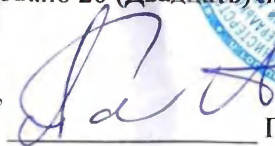
По вопросам качества набора реагентов «SARS-CoV-2 Нейтрализация количественный ИФА ИБХ РАН» обращаться в Институт Биоорганической Химии РАН по адресу: 115997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10, тел. (968) 431-15-05, e-mail: covid@ibch.ru

17. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ НА ВНУТРЕННЕЙ УПАКОВКЕ.

Графический символ	Его значение и обозначение	Графический символ	Его значение и обозначение
	Дата изготовления		Температурный диапазон
	Использовать до		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер серии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		Содержит раздражающий агент
	Биологический риск		Беречь от влаги
	Не допускать воздействия солнечного света		Не использовать при повреждении упаковки
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		

Прошито, пронумеровано 20 (Двадцать) листов

Директор ИБХ РАН,
академик



Габибов А.Г.

