

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН
НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера

_____ А.А. Тоголян

« ____ » _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Набора реагентов для иммуноферментного количественного
определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS)**

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
1 Общие сведения.....	3
2 Риски применения.....	5
3 Характеристика медицинского изделия.....	6
4 Меры предосторожности.....	10
5 Требуемое дополнительное оборудование и материалы.....	11
6 Анализируемые образцы.....	11
7 Проведение исследования.....	12
8 Учет и интерпретация результатов.....	15
9 Особые указания.....	18
10 Утилизация.....	18
11 Условия транспортирования, хранения и эксплуатации.....	19
12 Рекламации	20

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия (МИ) для *in vitro* диагностики «Набор реагентов для иммуноферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS)», разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

1. Общие сведения

1.1 Назначение

Набор реагентов для иммуноферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS) предназначен для количественного определения антител IgG-класса в сыворотке или плазме крови человека к N-белку коронавируса SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа с целью выявления сероконверсии у лиц, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2, с клиническими признаками COVID-19, переболевших или контактировавших с SARS-CoV-2 в прошлом при отсутствии клинической симптоматики.

1.2 Тип анализируемого образца

В качестве анализируемого образца используется плазма (в присутствии ЭДТА или цитрата натрия) или сыворотка периферической крови человека.

1.3 Потенциальные потребители

Потенциальными потребителями МИ являются специалисты учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (центры гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, противочумные учреждения, научные организации, санитарно-эпидемиологические службы министерств и ведомств), а также специалисты медицинских учреждений, имеющие специальность врача клинической лабораторной диагностики или биолога согласно требованиям Приказа Минздравсоцразвития №541н от 23.07.2010 г. и Приказа Минздрава №707н от 8.10.2015 г.

Согласно методическим рекомендациям МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» организация лабораторной диагностики COVID-19 осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с микроорганизмами II группы патогенности. Лаборатории, имеющие санитарно-

эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека III-IV групп патогенности и условия для работы (методом ПЦР или другими методами), могут организовывать работу по диагностике COVID-19 без выделения возбудителя, пользуясь зарегистрированными в установленном порядке на территории Российской Федерации тест-системами, в соответствии с инструкцией по применению.

К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лабораториях допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками Роспотребнадзора, на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.

1.4 Целевой анализ

Целевым анализом являются антитела человека класса IgG к N-белку коронавируса SARS-CoV-2. Вид анализа - количественный.

1.5 Диагностическая роль

МИ предназначено для клинической лабораторной диагностики *in vitro* в качестве вспомогательного средства для оценки уровня постковидного гумморального иммунитета. Увеличение концентрации IgG-антител в образцах сыворотки/плазмы свидетельствует о развитии иммунного ответа у лиц, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 с клиническими признаками COVID-19. Наличие IgG-антител в различных концентрациях у лиц с отсутствием клинической симптоматики свидетельствует о перенесенном заболевании или о контакте с коронавирусом.

1.6 Популяционные и демографические аспекты применения

Популяционные и демографические аспекты применения Набора реагентов N-CoV-2-IgG PS связаны с глобальным распространением инфекции, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2 в различных странах мира, и необходимостью оценки уровня популяционного постковидного иммунитета с целью принятия адекватных противоэпидемических мер.

1.7 Показания и противопоказания к применению, ограничения метода

Показанием к использованию Набора реагентов является необходимость оценки развития гуморального адаптивного иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2 у больных COVID-19 в процессе терапевтических мероприятий, а также у реконвалесцентов - с целью оценки сероконверсии и у здоровых людей - с целью оценки уровня популяционного иммунитета.

При соблюдении требований Инструкции по применению Набора реагентов N-CoV-2-IgG PS противопоказаний и ограничений по применению МИ не существует.

Набор реагентов не предназначен для оценки уровня поствакцинального иммунитета.

1.8 Специфическая патология

Для коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, характерно наличие клинических симптомов острой респираторной вирусной инфекции, в том числе повышение температуры тела, кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты), одышка, миалгии и утомляемость, ощущение заложенности в грудной клетке. Также среди первых симптомов в отдельных случаях отмечаются головные боли, кровохарканье, диарея, тошнота, рвота, сердцебиение. Инфекция, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, может проявляться в виде острого респираторного заболевания легкого течения, пневмонии, как без дыхательной недостаточности, так и с развитием острой дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического (инфекционно-токсического) шока. У пожилых людей, а также лиц с имеющимися соматическими заболеваниями, например, артериальной гипертензией, заболеваниями сердца или диабетом, вероятность тяжелого течения заболевания выше.

Продукция антител класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 в течение инфекционного процесса свидетельствует о развитии интегрированного иммунного ответа на коронавирус.

2. Риски применения

Все компоненты МИ в используемых концентрациях являются нетоксичными, поэтому по целевому назначению МИ безопасно и не обладает токсичностью.

2.1 Потенциальный риск применения

По степени потенциального риска применения МИ N-CoV-2-IgG PS относится к классу 2б.

2.2 Прямой риск применения

В состав калибровочной пробы (Калибратор), нулевой калибровочной пробы (K₀) и положительной контрольной пробы (K⁺) входят образцы сыворотки крови человека, которые не представляют биологической опасности, поскольку в ходе производства Набора реагентов протестированы на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и *Treponema pallidum*, а также антигенов р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Однако исследуемые образцы сыворотки, а также используемые растворы, оборудование и

материалы, находящиеся с ними в контакте, представляют собой потенциально инфекционный материал, обращаться с которым следует, соблюдая технику безопасности согласно ГОСТ Р52905-2007.

K+, K₀ и Калибратор содержат консервант – тимеросал– в концентрации 0,01%, не представляющей биологической опасности. Однако обращаться с ними следует, соблюдая технику безопасности согласно ГОСТ Р52905-2007.

Стоп-реагент содержит 1 N раствор серной кислоты, обращаться с которой следует, соблюдая технику безопасности согласно ГОСТ 4204-77 и ГОСТ Р52905-2007.

2.3 Косвенный риск применения

Косвенный риск применения N-CoV-2-IgG PS связан с вероятностью получения как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов, что может привести к ошибочному медицинскому решению и отрицательно повлиять на тактику терапевтических и противоэпидемических мероприятий.

Причинами ложноотрицательных результатов могут быть:

- 1) порча отдельных компонентов МИ в результате несоблюдения условий его транспортировки и хранения до использования;
- 2) превышение гарантийных сроков хранения, указанных на этикетках;
- 3) несоблюдение требований инструкции по применению в ходе обработки образцов.

3. Характеристика медицинского изделия

3.1 Принцип количественного метода исследования

В основе метода иммуноферментного анализа лежит взаимодействие антител, содержащихся в исследуемом образце, с антигеном, сорбированным в лунках полистиролового планшета, и последующим образованием иммунного комплекса с пероксидазным конъюгатом на основе моноклональных антител к тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG-класса. Визуализацию иммунного комплекса производят после добавления субстрата для пероксидазы хрена - 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ), который под действием атомарного кислорода, образующегося из перекиси водорода, окисляется до продукта, окрашенного в синий цвет. Добавление серной кислоты изменяет цвет раствора на желтый, с максимумом оптического поглощения при 450 нм. Оптическая плотность измеряется с помощью планшетного спектрофотометра для иммуноферментного анализа.

Количественное содержание антител в образце рассчитывают по калибровочной кривой, полученной при анализе семи разведений калибратора, представляющего собой

пул образцов сыворотки крови доноров, содержащий IgG-антитела к N-белку коронавируса SARS-CoV-2, в концентрации, выраженной в условных единицах (у.е./мл) или в международных антителосвязывающих единицах (Binding Antibody Units – BAU/мл).

Сорбированный в лунках планшета коронавирусный антиген, в качестве которого использован рекомбинантный N-белок нуклеокапсида коронавируса SARS-CoV-2, обеспечивает аналитическую специфичность тест-системы.

Область применения – для диагностики *in vitro*.

3.2 Состав медицинского изделия

Набор реагентов N-CoV-2-IgG PS выпускается в одном варианте комплектации и одном варианте исполнения, который рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая образцы разведений калибратора и контроля (K+ и K₀) (табл. 1).

Таблица 1

Наименование компонентов	Объем, мл	Количество
Планшет Антиген N-белок	-	1 шт.
Калибратор	0,4	1 пр.
K ₀	0,5	1 пр.
K +	0,5	1 пр.
Конъюгат	0,4	1 пр.
ФСР-Т	20,0	2 фл.
РИП	15,0	2 фл.
ХСР	13,0	1 фл.
Стоп-реагент	6,0	1 фл.
Инструкция по применению	-	1 шт.
Паспорт качества	-	1 шт.
Наименование принадлежностей		
Защитная пленка	-	2 шт.
Планшет для разведения	-	1 шт.

Планшет Антиген N-белок - 96-луночный разборный полистироловый планшет для иммуноферментного анализа с сорбированным N-белком коронавируса SARS-CoV-2. Планшет упакован в фольгированный пакет. Готов к использованию.

Калибратор (калибровочная проба) - прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой пул образцов сыворотки крови доноров, переболевших коронавирусным заболеванием COVID-19, содержащий IgG-антитела к N-белку коронавируса SARS-CoV-2, в буферном растворе объемом 0,4 мл в пробирке с завинчивающейся крышкой. Концентрация антител в Калибраторе составляет 120,0±6,0

у.е./мл. Калибратор предназначен для получения путем разведения калибровочных проб, содержание антител в которых используется для построения калибровочной кривой.

K_0 (нулевая калибровочная проба) – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой пул образцов сыворотки крови, полученных от здоровых доноров ранее 2019 года, не содержащий IgG-антител к N-белку коронавируса SARS-CoV-2. Результат измерения K_0 используется для построения калибровочной кривой в качестве нулевой точки. K_0 разведен в буферном растворе объемом 0,5 мл в пробирке с завинчивающейся крышкой. Готов к использованию.

K^+ (контрольная положительная проба) – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой пул образцов сыворотки крови доноров, переболевших коронавирусным заболеванием COVID-19, содержащий IgG-антитела к N-белку коронавируса SARS-CoV-2, в буферном растворе объемом 0,5 мл в пробирке с завинчивающейся крышкой. Готов к использованию.

Конъюгат – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 50-кратный концентрат мышиных моноклональных антител к тяжелой цепи IgG человека, меченных пероксидазой хрена, объемом 0,4 мл в пробирке с завинчивающейся крышкой.

ФСР-Т – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 25-кратный концентрат промывочного раствора объемом 20 мл во флаконе с завинчивающейся крышкой.

РИП – прозрачная жидкость сине-фиолетового цвета, представляющая собой буферный раствор для разведения исследуемых проб объемом 15 мл во флаконе с завинчивающейся крышкой. Готов к использованию

ХСР – прозрачная жидкость слегка голубоватого цвета, представляющая собой хромоген-субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода объемом 13 мл во флаконе с завинчивающейся крышкой. Готов к использованию.

Стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 1 N раствор серной кислоты объемом 6 мл во флаконе с завинчивающейся крышкой. Готов к использованию.

Защитная пленка – полиэтиленовая пленка с клейкой поверхностью для заклеивания планшета с антигеном.

Планшет для разведения – 96-луночный планшет с плоским дном для предварительного разведения калибратора и образцов.

3.3 Функциональные характеристики

Точность (правильность) измерений концентрации антител в образце находится в пределах от 90 % до 110 % (тест на открытие).

Чувствительность (предел обнаружения) количественного определения антител в образце составляет 0,2 у.е./мл.

Диапазон измерений – 1,0 – 60,0 у.е./мл, подтвержден для измерений Первого Международного Стандарта ВОЗ для антител к SARS-CoV-2 (NIBSC code 20/136) в диапазоне 0,16 - 10,00 ВАУ/мл;

Значение линейности при определении концентрации антител в образцах в интервале 0,3 - 55,0 у.е./мл находится в пределах от 90 % до 110 %.

Концентрация антител в контрольной пробе К+ должна находиться в интервале 1,2-2,5 у.е./мл.

Воспроизводимость значений концентраций антител в образцах по коэффициенту вариации (CV) не превышает 8,0 %.

Интерсепты. 80 % значению logit соответствует значение интерсепта в интервале от 19,0 до 21,0 у.е./мл; 50 % значению logit соответствует значение интерсепта в интервале от 6,5 до 8,5 у.е./мл; 20 % значению logit соответствует значение интерсепта в интервале от 2,0 до 3,0 у.е./мл.

Аналитическая специфичность

Перекрестная реактивность. Не обнаружено перекрестной реактивности при анализе образцов плазмы/сыворотки крови, полученных от переболевших людей, содержащих антитела к возбудителям инфекционных заболеваний (*HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, Adenovirus, Influenza A virus, Influenza B virus, Parainfluenza virus, Respiratory syncytial virus, EBV, Chlamidia pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae*).

Влияние интерферирующих веществ. Присутствие антикоагулянтов (ЭДТА, цитрат натрия), а также присутствие гемоглобина (до 10 мг/мл), общего билирубина (до 0,6 мг/мл) и триглицеридов (до 0,5 мг/мл) в анализируемых образцах не влияет на результаты анализа.

Образцы плазмы/сыворотки крови, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием 10 мин при 6000 об./мин. Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом в виду

возможной интерференции гемоглобина, липидов и бактериальных продуктов с антителами, что может привести к ложноположительным результатам. Обязательным условием является разбавление анализируемой сыворотки в 100 раз перед использованием, что гарантирует нивелирование действия возможных интерферентов, присутствующих в неразбавленных образцах.

4. Меры предосторожности

4.1 Работа с Набором реагентов должна проводиться в лаборатории, выполняющей микробиологические, серологические и диагностические исследования с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и методических указаний МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.2 При работе необходимо выполнять следующие требования:

- постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С;
- перед началом работы следует ознакомиться с инструкцией по применению;
- все компоненты Набора реагентов перед началом работы необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 мин;
- не допускается использование Набора реагентов после истечения его срока годности, указанного на упаковке;
- лабораторная посуда должна быть тщательно промыта, предпочтительно применение материалов одноразового использования;
- необходимо использовать валидированные дозаторы и оборудование;
- работы по пипетированию должны выполняться с использованием одноразовых наконечников для полуавтоматических пипеток.
- все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями 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».

- не допускать контакта образцов Набора реагентов с глазами и слизистой оболочкой. При контакте обильно промыть участок контакта водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- во избежание деградации нанесенного биоматериала при работе с компонентами Набора реагентов следует избегать воздействия высоких температур, влаги и прямого солнечного света.

4.3 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

Все компоненты Набора реагентов за исключением Стоп-реагента являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав Стоп-реагента, обладает раздражающим действием. При попадании раствора Стоп-реагента на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5. Требуемое дополнительное оборудование и материалы:

- спектрофотометр вертикальный для ИФА с длинами волн 450 нм и референс-фильтром 650 нм;
- вошер автоматический для иммунологических планшетов;
- термостатируемый вибровстряхиватель;
- термостат воздушный с регулировкой температуры на 37 °С;
- дозаторы пипеточные 1-канальные с переменным объёмом от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл;
- дозаторы пипеточные 8-канальные с переменным объёмом от 5 до 50 мкл и от 30 до 300 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 10-200 мкл и 200-1000 мкл;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709 -72);
- фильтровальная бумага;
- ванночки для реагентов;
- мерные стеклянные цилиндры;
- флаконы для разведения конъюгата.

6. Анализируемые образцы

Согласно Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с

микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты.

Транспортировка образцов осуществляется с соблюдением требований СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». На сопровождающем формуляре необходимо указать наименование подозреваемой острой респираторной инфекции, предварительно уведомив лабораторию о том, какой образец транспортируется.

Образцы крови в присутствии антикоагулянтов или без них транспортируются при температуре 2 – 8 °С.

Сбор образцов крови проводить путем венепункции, при соблюдении стандартных лабораторных процедур. Выбор пробирок для получения сыворотки или плазмы, подготовку, центрифугирование, хранение и транспортировку образца производить согласно правилам проведения преаналитического этапа, утвержденным для лаборатории. Способы подготовки образца (сыворотки или плазмы) и режимы центрифугирования описаны в инструкциях по применению пробирок для забора крови, используемых лабораторией.

Исследуемые образцы сыворотки/плазмы хранят при температуре 2-8 °С не более 3 суток от момента взятия крови. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Перед использованием образцы размораживают при температуре 16-25 °С и перемешивают встряхиванием. Образцы, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием 10 мин при 6000 об/мин. Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, иктеричностью, хилезом и бактериальным проростом. Повторное замораживание разведенных образцов не допускается.

ВНИМАНИЕ! Образцы сыворотки/плазмы могут подвергаться замораживанию/оттаиванию не более 2-х раз. Непригодными для исследования являются образцы плазмы крови, если кровь была взята в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

7. Проведение исследования

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Реагенты, готовые к применению

7.1.1.1 Планшет Антиген N белок. Разборный планшет упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. В случае необходимости оставить в рамке-держателе необходимое количество стрипов. Остальные стрипы немедленно поместить обратно в фольгированный пакет, удалить из него воздух и загерметизировать пакет зип-лок застежкой. Неиспользованные стрипы хранить в фольгированном пакете в течение 1 месяца после вскрытия при температуре 2-8 °С.

7.1.1.2. Реагенты К+, К₀, РИП, ХСР, Стоп-реагент – готовы к использованию.

Частично использованные К+, К₀, Калибратор, РИП, ХСР, Стоп-реагент хранить в закрытых пробирках и флаконах в течение 1 месяца после вскрытия при температуре 2-8 °С.

7.2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

7.2.1. Подготовка раствора ФСР-Т

Раствор ФСР-Т используется для промывания планшета и для разведения Конъюгата. Для получения рабочего раствора исходный 25-кратный концентрат ФСР-Т разводят в 25 раз. В мерный цилиндр, в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу 2), вносят нужное количество концентрата ФСР-Т и доводят до соответствующего объема дистиллированной водой. Полученный раствор следует хранить не более 30 суток при температуре 2-8 °С.

7.2.2 Подготовка раствора Конъюгата

Конъюгат развести в рабочем растворе ФСР-Т в соотношении 1:50. Для этого, в соответствии с числом используемых стрипов, к нужному количеству раствора ФСР-Т добавляют необходимое количество концентрата Конъюгата (см. таблицу 2). Полученный рабочий раствор Конъюгата следует хранить не более 4 ч при температуре 2-8 °С.

Таблица 2

Расход реагентов, требующих предварительного приготовления

Кол-во стрипов	Рабочий раствор ФСР-Т		Рабочий раствор Конъюгата	
	х25 ФСР-Т, мл	Дист. вода, мл	Конъюгат, мл	Рабочий раствор ФСР-Т, мл
4	5	до 125	0,07	3,5
6	10	до 250	0,1	5
8	15	до 375	0,14	7
12	20	до 500	0,25	12,5

7.3. Проведение иммуноферментного анализа

Точность приготовления разведений Калибратора и исследуемых образцов определяет качество результатов анализа. Предварительные разведения проводить в индивидуальных пробирках (типа Эпендорф) или в лунках дополнительного 96-луночного планшета, тщательно перемешивая пробы пипетированием с использованием чистых наконечников.

7.3.1. Приготовление калибровочных проб

В 7 пробирок внести по 120 мкл раствора РИП. В пробирку 1 внести 120 мкл Калибратора и тщательно перемешать пипетированием. Это разведение калибровочной пробы К1 соответствует концентрации 60 у.е./мл.

Из пробирки 1 перенести 120 мкл в пробирку 2 и тщательно перемешать.

Из пробирки 2 перенести 120 мкл в пробирку 3 и т.д. до пробирки 7. Эти 2-кратные разведения являются калибровочными пробами К2, К3, К4, К5, К6, К7.

7.3.2. Предварительное разведение исследуемых образцов сыворотки/плазмы

В пробирки (лунки дополнительного планшета) внести по 190 мкл раствора РИП. Внести в них по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (разведение – 1:20).

7.3.3. Внесение разведенных калибровочных проб

В лунки **A-G** стрипа 1 Планшета Антиген N-белок внести по 100 мкл разведенных калибровочных проб К1 - К7. В лунку Н1 внести 100 мкл нулевой калибровочной пробы К₀.

7.3.4. Внесение предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки/плазмы и положительной контрольной пробы.

Начиная с лунки А2, внести в лунки по 80 мкл раствора РИП, затем внести в лунки по 20 мкл предварительно разведенных в 20 раз образцов сыворотки/плазмы. При этом, конечное разведение образцов составит 1:100. В последнюю пустую лунку используемых стрипов внести 100 мкл положительной контрольной пробы К+ (таблица 3).

Содержимое лунок слегка встряхнуть постукиванием планшета в течение 10 секунд, заклеить защитной пленкой и инкубировать 1 ч при температуре 37 °С.

Таблица 3

Схема внесения калибровочных проб, исследуемых образцов и К+

	1	2	3	4
А	К1	Образец 1	Образец 9	Образец 17
В	К2	Образец 2	Образец 10	Образец 18
С	К3	Образец 3	Образец 11	Образец 19

D	K4	Образец 4	Образец 12	Образец 20
E	K5	Образец 5	Образец 13	Образец 21
F	K6	Образец 6	Образец 14	Образец 22
G	K7	Образец 7	Образец 15	Образец 23
H	K ₀	Образец 8	Образец 16	K+

7.3.5. Промывка. После инкубации снять защитную пленку со стрипов или планшета и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Раствор из лунок удалить автоматическим промывателем (вошером) или декантацией в сосуд, заполненный до половины 6 % раствором перекиси водорода. Затем лунки промыть, внося в каждую лунку по 300 мкл раствора ФСР-Т, встряхнуть содержимое лунок путем легкого постукивания планшета в течение 10 секунд и удалить содержимое лунок путем аспирации или декантации. Промывку повторить 3 раза. После последней промывки тщательно удалить остаточную влагу постукиванием перевернутого планшета по чистой фильтровальной бумаге.

7.3.6. Инкубация с Конъюгатом. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора Конъюгата. Планшет закрыть защитной пленкой и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение 1 ч. Затем процедуру промывания осуществить, как указано в п. 7.3.5.

7.3.7. Проведение ферментативной реакции. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл субстратного раствора ХСР. Инкубировать в защищенном от света месте при температуре 18 - 22 °С в течение 10 минут.

7.3.6 Остановка ферментативной реакции. Во все лунки внести по 50 мкл Стоп-реагента.

8. Учет и интерпретация результатов

8.1 Измерение оптической плотности (ОП) и определение концентрации антител

Учет результатов анализа проводить спектрофотометрическим методом не позднее чем через 15 мин после внесения Стоп-реагента, при длине волны 450 нм и волны сравнения 650 нм с настройкой прибора по «воздуху» на иммуноферментном анализаторе с программным обеспечением. Согласно инструкции к прибору, перед проведением анализа на приборе создают шаблон планшета, в котором задают значения концентраций антител в калибровочных пробах (стандартах), привязанных к ячейкам А-Н стрипа 1.

Результат учитывается, если значение ОП в лунках с K₀ не превышает 0,10 оптических единиц (о.е.) и не менее 0,25 о.е. с K+, а значение ОП в лунках с

калибровочной пробой К1 (60 у.е./мл) должно быть не менее 1,50 о.е.

Калибровочный график строится с использованием данных Таблицы 4 и соответствующих значений ОП с помощью программного обеспечения иммуноферментного анализатора или вручную путем построения графика с помощью прикладных программ, например, Excel. Тип калибровочной кривой задается от точки к точке. Пример графика представлен на рисунке 1 (только для демонстрации). По графику находят значения концентраций антител, выраженные в у.е./мл, соответствующие значениям ОП исследуемых разведенных образцов сыворотки/плазмы. Образцы, значения концентраций антител в которых находятся ниже 1,0 у.е./мл, считаются отрицательными. Если концентрация антител в исследуемом образце превышает 60 у.е./мл, то данный образец разводят в 200 раз и повторно анализируют. Значения концентраций антител в исследуемых разведенных образцах, определённые по калибровочной кривой, умножают на 100 или 200 в соответствии с разведением образцов сыворотки/плазмы крови 1:100 или 1:200.

Таблица 4

Значения концентраций IgG-антител к N-белку SARS-CoV-2 (у.е./мл) в калибровочных образцах, используемых для построения калибровочной кривой

Образцы калибратора	Нормативная концентрация антител
	у.е./мл
К1	60
К2	30
К3	15
К4	7,5
К5	3,75
К6	1,86
К7	0,93
К ₀	0

Калибровочная кривая должна быть построена одновременно с исследуемыми образцами сыворотки/плазмы.

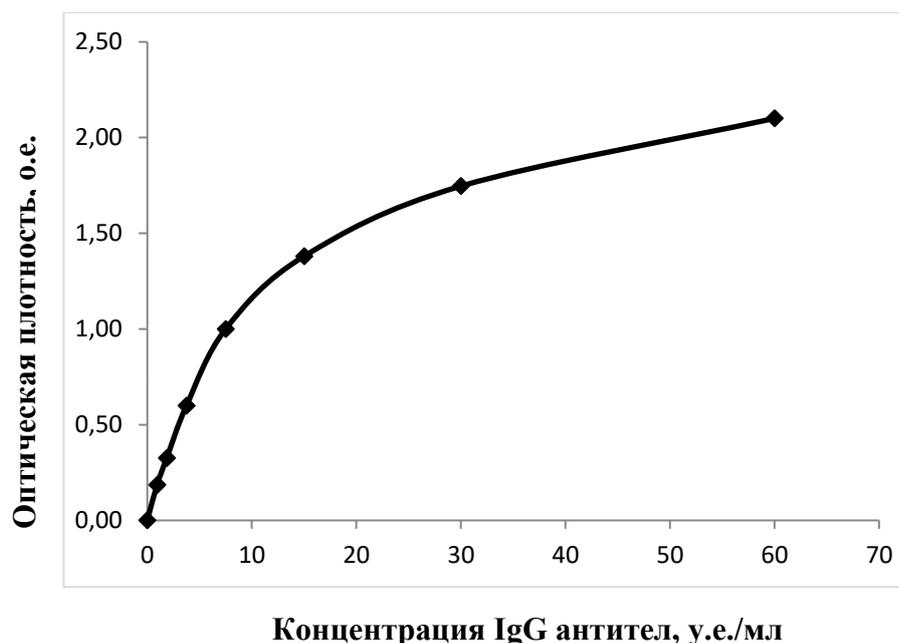


Рисунок 1. Типичная калибровочная кривая для определения концентраций IgG-антител к N-белку SARS-CoV-2 в образцах сыворотки/плазмы крови

Согласно письму Росздравнадзора «О международном формате оценки уровня иммуноглобулинов, в том числе IgG, к SARS-CoV-2» от 05.07.2021 г. № 02-л-840/21 медицинские организации должны при проведении лабораторных исследований с использованием тест-систем для количественного определения содержания иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 представлять результаты таких исследований с использованием условных единиц BAU- «binding antibody units» («единицы связывающих антител») (BAU/мл).

Для перевода значений концентрации антител в международные единицы (BAU/мл) необходимо полученные значения концентраций в у.е./мл поделить на коэффициент пересчета - 6,0, установленный производителем и подтвержденный клиническими испытаниями.

Диапазон измерений концентрации антител в разведенных образцах Международного Стандарта ВОЗ, установленный производителем и подтвержденный клиническими испытаниями, составляет 0,16 - 10,00 BAU/мл.

8.2 Интерпретация результатов

Концентрации специфических IgG-антител к N-белку SARS-CoV-2 в исследуемых образцах оцениваются следующим образом. Образцы, в которых рассчитанная концентрация ниже 100 у.е./мл, считаются отрицательными, образцы, у которых

рассчитанная концентрация выше 100 у.е./мл оцениваются как положительные.

Оценку уровня специфических IgG-антител к N-белку SARS-CoV-2 в цельных образцах проводят согласно таблице 5.

Положительный результат ИФА, то есть, выявление антител к N-белку SARS-CoV-2, может свидетельствовать как о текущем заболевании COVID-19, так и об инфицированности в прошлом. Низкое и очень низкое значение уровня антител свидетельствует о слабом иммунном ответе к коронавирусу SARS-CoV-2 у пациента переболевшего COVID-19. Средние и ниже значения уровней антител могут считаться показателем для рекомендации пациенту проведения ревакцинации.

Таблица 5

Концентрация УЕ/мл	Концентрация ВАУ/мл	Уровень IgG-антител
> 4000	> 667	очень высокий
4000-2000	666 - 333	высокий
1999 - 750	332 - 125	средний
749- 190	124 - 32	низкий
189 - 100	31 - 17	очень низкий
< 100	< 17	отрицательный

9. Особые указания

9.1 При работе с компонентами Набора реагентов необходимо обращать внимание на тщательность перемешивания реагентов, постоянно контролировать точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток.

9.2 Образцы сыворотки или плазмы, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин. Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, иктеричностью, хилезом и бактериальным проростом.

9.3 При работе нельзя допускать подсыхания лунок во время их промывки, избегать попадания прямых солнечных лучей на используемые компоненты.

9.4. Набор реагентов предназначен для выявления антител класса IgG к N-белку коронавируса SARS-CoV-2 в образцах сыворотки или плазмы крови человека. Набор реагентов не предназначен для определения антител в слюне, мокроте и других образцах биологического материала.

9.5 Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры теста могут повлиять на результаты.

9.6 Набор не предназначен для тестирования образцов сыворотки или плазмы крови новорожденных.

9.7 Набор не нуждается в дополнительной калибровке с помощью каких-либо дополнительных контрольных материалов.

10. Утилизация

Отходы, образующиеся после использования набора реагентов, относятся к классу Б, и утилизируются 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, 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» с помощью специализированных организаций.

После завершения работы исследуемые образцы клинического материала, находившиеся с ними в контакте реагенты, материалы и инструменты дезинфицируют растворами 6 % перекиси водорода, 70% этилового спирта или 3 % хлорамина Б в соответствии с СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний».

После обеззараживания инструменты не одноразового использования подвергают мойке (в зависимости от типа материала). Инструменты и материалы для одноразового использования собираются в одноразовую упаковку (в зависимости от морфологического состава отходов) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. При окончательной упаковке отходов для удаления их из подразделения (организации) одноразовые емкости (пакеты, баки) с отходами маркируются соответствующим образом.

Далее емкости перемещают на участок по обращению с отходами или в помещение для временного хранения медицинских отходов класса Б до последующего вывоза транспортом специализированных организаций к месту обеззараживания/обезвреживания.

11. Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

11.1 Требование к транспортированию

Транспортирование Набора реагентов может проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта при температуре 2–8 °С, требующих соблюдения «холодовой цепи» в термоконтейнерах, содержащих хладоземента.

11.2 Хранение

Набор реагентов N-CoV-2-IgG PS следует хранить в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в течение всего срока годности.

Набор реагентов, хранившийся и транспортированный с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

После вскрытия набора отдельные компоненты набора могут храниться при применении в течение 1 месяца при 2-8 °С в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

11.3 Срок годности набора реагентов

Гарантийный срок годности по данным исследования в режиме ускоренного старения составляет 12 месяцев (9 месяцев по данным исследования в реальном времени) с даты утверждения ОБТК и указан на этикетке Набора реагентов. По истечении срока годности Набор реагентов использованию не подлежит.

12. Рекламации

По вопросам, касающимся качества медицинского изделия «Набор реагентов для иммуноферментного количественного определения антител класса IgG человека к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS)» следует обращаться к предприятию-изготовителю: Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) по адресу: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, телефон: (812) 233 20 92, e-mail: pasteur@pasteurorg.ru, <https://www.pasteurorg.ru>.