УТВЕРЖДАЮ
Главный врач
ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
_____ А.Л. Скуранович
«__» _____2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для количественного определения IgG к рецептор-связывающему домену (РСД) S белка SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-РСД-ИФА-QA-G» (ТУ BY 100558032.433-2024)

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
_____ М.И. Злотникова
«__» _____2024 г.

СОГЛАСОВАНО
Заместитель главного врача
ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»
_____Г.В. Гетюк
«__» _____2024 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
_____ А.А. Тарасенко
«__» _____2024 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска
_____ Н.Н. Юровский
«__» _____2024 г.

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

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Государственное учреждение
Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья
220114 г. Минск, ул. Филимонова, 23, тел. 373-81-75

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для количественного определения IgG к рецептор-связывающему домену (РСД) S белка SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-РСД-ИФА-QA-G»
ТУ BY 100558032.433-2024; Рег. удостов. № ИМ-_._____

Основой набора реагентов для количественного определения иммуноглобулинов G к SARS-CoV-2 и индекса их авидности (далее набор реагентов) является рекомбинантный вирус-специфический белок РСД S белка вируса. Основным свойством набора является его способность выявлять IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке/плазме крови пациентов за счет их взаимодействия с иммобилизованным на лунках планшета рекомбинантным белком. Образованный комплекс антиген-антитело выявляется с помощью иммунопероксидазного конъюгата. Авидность анти-РСД IgG оценивается по доле связавшихся с антигеном антител после диссоциации комплекса IgG-РСД.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для количественного определения антител класса G к РСД S белка SARS-CoV-2 и индекса их авидности в сыворотке/плазме крови пациентов.

Набор рассчитан на проведение 48/96 исследований (определение индекса авидности/ концентрации антител), включая контрольные и калибровочные образцы.

СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Краткое название компонента	Описание компонента	№	Кол-во
	планшет полистироловый из 12 разборных стрипов с иммобилизованным на поверхности лунок рекомбинантным SARS-CoV-2-специфическим полипептидом		1 шт.
	планшет полистироловый из 12 разборных стрипов для предварительного разведения образцов		1 шт.
ПК	положительный контроль, содержащий анти-РСД IgG	**№1**	1 фл.
ОК	отрицательный контроль, не содержащий анти-РСД IgG	**№2**	1 фл.
К1-К5	калибровочные образцы с известной концентрацией анти-РСД IgG, выраженной в BAU/ml (BAU – «единицы связывающих антител»)	**№3**	5 фл.
$ВА_к$	контроль, содержащий высокоавидные анти-РСД-IgG	**№4**	1 фл.
$НА_к$	контроль, содержащий низкоавидные анти-РСД-IgG	**№5**	1 фл
ХА	раствор хаотропного агента (допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°С)	**№6**	1 фл.
РС	раствор сравнения	**№7**	1 фл.
конъюгат*	мышиный конъюгат к IgG человека, меченный пероксидазой хрена	**№8**	1 фл.
РПРО	раствор для предварительного разведения исследуемых образцов	**№9**	1 фл.
РРКО	раствор для разведения конъюгата/ исследуемых образцов	**№10**	1 фл.
ФСТБ*	фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор (концентрат (х26), допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°С)	**№11**	2 фл.
ТМБ	субстратный раствор тетраметилбензидин	**№12**	1 фл.
стоп-реагент	раствор серной кислоты	**№13**	1 фл.
	Пакет полиэтиленовый с замком zip-lock		1 шт.
	Инструкция по применению		1 шт.

*** - реагенты, требующие разведения**

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

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

– Все манипуляции с биологическим материалом пациентов осуществляют в соответствии с требованиями безопасности при работе с ПБА 2 группы риска (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки» от 06.01.2017 г.).

– Персонал, проводящий исследования, должен использовать средства индивидуальной защиты, рекомендованные при работе с биологическим материалом, зараженным/подозрительным на заражение коронавирусом SARS-CoV-2.

– Сыворотка/плазма крови человека, используемая для приготовления контролей, инактивирована нагреванием, проверена и считается не содержащей HBsAg, антигена p24 ВИЧ-1, антител к SARS-CoV-2 (кроме положительного контроля), ВИЧ 1/2 и гепатита С.

– Стоп-реагент содержит серную кислоту - не допускать попадания на кожу и слизистые.

– Компоненты набора содержат консервант (ProClin 300) в концентрациях, являющихся нетоксичными.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ

– термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С (любой марки);

– спектрофотометр, имеющий светофильтр на 450 нм и 620-650 нм (любой марки), для измерения оптической плотности в планшетах;

– аппарат для промывания планшетов (вошер);

– холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2 до плюс 8°С (любой марки);

– автоматические пипетки одноканальные переменного объема на (2-20) мкл, (20-200) мкл, (100-1000) мкл (любой марки) и наконечники к ним;

– автоматические пипетки восьмиканальные переменного объема на (10-300) мкл и наконечники к ним;

– посуда лабораторная - мерный стакан или цилиндр объемом 500мл, флаконы объемом 5,0 мл, 50,0 мл, 500,0 мл;

– пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл;

– штативы для пробирок (любой марки);

– вода дистиллированная или деионизированная;

– спирт этиловый, 70%;

– вата медицинская гигроскопическая;

– перчатки медицинские одноразовые;

– дезинфицирующие средства;

– фильтровальная бумага;

– ванночки для реагентов;

– контейнер для потенциально инфекционных отходов.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1 Взятие биологического материала

Исследуемый материал – сыворотка или плазма крови без признаков выраженного гемолиза, или хилеза.

Кровь пациентов отбирают не ранее 10 суток от начала заболевания.

Сыворотку получают путем взятия не менее 1,0 мл крови в специальные пробирки без антикоагулянтов, или с активаторами свертывания крови, в том числе с разделяющим гелем. Для получения плазмы кровь берут в пробирки с антикоагулянтами (ЭДТА, гепарин, цитрат натрия). Сыворотку/плазму крови получают стандартным методом. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

Хранят образцы до анализа не более 5 дней при температуре от 2 до 8° С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре минус 20°С в течение шести месяцев, при температуре минус 70°С в течение двух лет. Не используют образцы сывороток, которые замораживались/оттаивались более трех раз. При размораживании образцов плазмы для предупреждения осаждения фибрина образцы быстро размораживают при плюс (38-40)°С. Размороженные образцы после оттаивания обязательно тщательно перемешивают.

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

2 Подготовка реагентов.

А) Реагенты, готовые к применению:

• Планшет разборный с иммобилизованным коронавирус SARS-CoV-2-специфическим рекомбинантным белком РСД SARS-CoV-2

- ПК;
- ОК;
- К1-К5;
- $ВА_к$;
- $НА_к$;
- ХА;
- РС;
- РПРО;
- РРКО;
- ТМБ;
- стоп-реагент;

Б) Реагенты, требующие предварительного разведения:

• Приготовление рабочего промывочного раствора. Перед приготовлением рабочего промывочного раствора содержимое флакона с концентратом ФСТБ **(№11)** тщательно перемешивают. При выпадении в концентрате осадка солей необходимо прогреть его при температуре (30-40)°С до полного растворения осадка. Необходимый объем концентрата разводят в 26 раз соответствующим объемом дистиллированной воды (см. табл. 1) и тщательно перемешивают.

Таблица 1 – Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов планшета

Количество стрипов, шт	1	2	**3**	4	5	**6**	7	8	**9**	10	11	**12**
Количество ФСТБ, концентрат (х26), мл – фл. **№11**	3	6	**10**	12	15	**20**	21	24	**30**	31	33	**40**
Количество дистиллированной воды, мл	75	150	**250**	300	375	**500**	525	600	**750**	775	825	**1000**

• Приготовление рабочего раствора конъюгата. Перед приготовлением содержимое флакона **№8** тщательно перемешивают пипетированием. Затем, в зависимости от количества используемых стрипов (см. табл. 2), в чистый флакон вносят необходимый объем РРКО **(№10)** и соответствующий объем конъюгата пероксидазного **(№8).** Осторожно перемешивают, не допуская вспенивания.

Таблица 2 – Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов планшета

Количество стрипов, шт	1	2	**3**	4	5	**6**	7	8	**9**	10	11	**12**
Количество коньюгата пероксидазного **(№8)**, мл	0,05	0,10	**0,15**	0,2	0,25	**0,3**	0,35	0,4	**0,45**	0,5	0,55	**0,6**
Количество РРКО **(№10)**, мл	1,0	2,0	**3,0**	4,0	5,0	**6,0**	7,0	8,0	**9,0**	10,0	11,0	**12,0**

Г) Исследуемые образцы сывороток крови не требуют предварительной подготовки.

3 Постановка иммуноферментного анализа (ИФА)

3.1 Непосредственно перед постановкой ИФА все используемые реагенты и образцы биологического материала выдерживают 15-30 минут при комнатной температуре. При выпадении во флаконах с реагентами ХА (№6) и ФСТБ (№11) осадка солей, необходимо прогреть их при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

3.2 Планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным вирусспецифическим белком извлекают из пакета. Отбирают необходимое для исследования проб количество стрипов, учитывая, что при проведении исследования данным набором реагентов доступны три варианта постановки для: **определения концентрации анти-РСД-IgG, выраженной в BAU/ml (№1), определения индекса авидности анти-РСД-IgG (№2), совокупного определения концентрации анти-РСД-IgG и индекса их авидности (№3).**

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

Вариант постановки №1 (определение концентрации анти-РСД-IgG)

В данном варианте постановки используются контроли и калибровочные образцы: ПК, ОК, К1-К5.

3.3.1 Для образцов сыворотки/плазмы крови готовят разведение в планшете полистироловом для предварительного разведения образцов. Исходя из количества исследуемых образцов отбирают необходимое количество стрипов и в каждую лунку планшета вносят 90 мкл РПРО (**№9**) +10 мкл исследуемого образца, пипетируют. При разведении образца цвет РПРО должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать ложный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

3.4.1 Калибровочные образцы и контроли **(за исключением $ВА_к$ и $НА_к$)** вносят по 100 мкл из расчета того, что каждый калибровочный образец К1-К5 вносится в одну лунку, ПК – в одну лунку, ОК – в две лунки.

Например: В лунки А1-Е1 последовательно вносят калибровочные образцы К1-1000 BAU/ml→К2-500 BAU/ml→К3-250 BAU/ml→К4-100 BAU/ml→К5-10 BAU/ml, в следующую лунку F1-ПК в лунки G и H– ОК.

Рекомендуемая схема внесения калибровочных и контрольных образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	К1	Обр1	Обр9	Обр17	Обр25	Обр33	Обр41	Обр49	Обр57	Обр65	Обр73	Обр81
B	К2	Обр2	Обр10	Обр18	Обр26	Обр34	Обр42	Обр50	Обр58	Обр66	Обр74	Обр82
C	К3	Обр3	Обр11	Обр19	Обр27	Обр35	Обр43	Обр51	Обр59	Обр67	Обр75	Обр83
D	К4	Обр4	Обр12	Обр20	Обр28	Обр36	Обр44	Обр52	Обр60	Обр68	Обр76	Обр84
E	К5	Обр5	Обр13	Обр21	Обр29	Обр37	Обр45	Обр53	Обр61	Обр69	Обр77	Обр85
F	ПК	Обр6	Обр14	Обр22	Обр30	Обр38	Обр46	Обр54	Обр62	Обр70	Обр78	Обр86
G	ОК	Обр7	Обр15	Обр23	Обр31	Обр39	Обр47	Обр55	Обр63	Обр71	Обр79	Обр87
H	ОК	Обр8	Обр16	Обр24	Обр32	Обр40	Обр48	Обр56	Обр64	Обр72	Обр80	Обр88

3.5.1 В остальные лунки вносят по 90 мкл РРКО **(№10)** и по 10 мкл предварительно разведенных в 10 раз образцов, тщательно перемешивают. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Стрипы накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^0$С.

3.6.1 Промывают планшет 5 раз рабочим промывочным раствором. Для этого предварительно удаляют содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором. Затем в каждую лунку вносят не менее 0,36 мл рабочего промывочного раствора, выдерживают 30 сек, удаляют содержимое и повторяют эту процедуру еще 4 раза.

3.7.1 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата. Инкубируют 30 мин при $(37 \pm 1)^0$С. Промывают 5 раз рабочим промывочным раствором (см. п. 3.6).

3.8.1 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл ТМБ.

3.9.1 Планшет выдерживают в течение 10 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.

3.10.1 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл стоп-реагента для остановки цветной реакции.

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

Вариант постановки №2 (определение индекса авидности анти-РСД-IgG)

В данном варианте постановки используются контроли и калибровочные образцы: $ВА_к$ и $НК_к$, ОК.

3.3.2 Для образцов сыворотки/плазмы крови готовят разведение в планшете полистироловом для предварительного разведения образцов. Исходя из количества исследуемых образцов отбирают необходимое количество стрипов и в каждую лунку планшета вносят 90 мкл РПРО (**№9**) +10 мкл исследуемого образца, пипетируют. При разведении образца цвет РПРО должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать ложный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

3.4.2 Контроли **(за исключением К1-К5 и ПК)** вносят по 100 мкл из расчета того, что каждый контрольный образец вносится в 2 лунки разных стрипов.

Например: В лунки А1-А2 вносят $ВА_к$, в лунки В1-В2 вносят $НА_к$, в лунки С1-С2 вносят ОК.

Рекомендуемая схема внесения контрольных образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$ВА_к$	$ВА_к$	Обр6	Обр6	Обр14	Обр14	Обр22	Обр22	Обр30	Обр30	Обр38	Обр38
B	$НА_к$	$НА_к$	Обр7	Обр7	Обр15	Обр15	Обр23	Обр23	Обр31	Обр31	Обр39	Обр39
C	ОК	ОК	Обр8	Обр8	Обр16	Обр16	Обр24	Обр24	Обр32	Обр32	Обр40	Обр40
D	Обр1	Обр1	Обр9	Обр9	Обр17	Обр17	Обр25	Обр25	Обр33	Обр33	Обр41	Обр41
E	Обр2	Обр2	Обр10	Обр10	Обр18	Обр18	Обр26	Обр26	Обр34	Обр34	Обр42	Обр42
F	Обр3	Обр3	Обр11	Обр11	Обр19	Обр19	Обр27	Обр27	Обр35	Обр35	Обр43	Обр43
G	Обр4	Обр4	Обр12	Обр12	Обр20	Обр20	Обр28	Обр28	Обр36	Обр36	Обр44	Обр44
H	Обр5	Обр5	Обр13	Обр13	Обр21	Обр21	Обр29	Обр29	Обр37	Обр37	Обр45	Обр45

3.5.2 В остальные лунки вносят по 90 мкл РРКО **(№10)** и по 10 мкл предварительно разведенных в 10 раз образцов **в 2 повторах** аналогично внесению контрольных образцов. Тщательно перемешивают. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Стрипы накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^0$С.

3.6.2 Промывают планшет 5 раз рабочим промывочным раствором. Для этого предварительно удаляют содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором. Затем в каждую лунку вносят не менее 0,35 мл рабочего промывочного раствора, выдерживают 30 сек, удаляют содержимое и повторяют эту процедуру еще 4 раза.

3.7.2 В нечетные стрипы (№№ 1, 3, 5 и далее) вносят по 100 мкл РС (№7). В четные стрипы (№№ 2, 4, 6 и далее) вносят по 100 мкл ХА (№6).

Стрипы накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 15 мин при температуре $(37 \pm 1)^0$С. Промывают 5 раз рабочим промывочным раствором (см. п. 3.6).

3.8.2 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата. Инкубируют 30 мин при $(37 \pm 1)^0$С. Промывают 5 раз рабочим промывочным раствором (см. п. 3.4).

3.9.2 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл ТМБ.

3.10.2 Планшет выдерживают в течение 10 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.

3.11.2 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл стоп-реагента для остановки цветной реакции.

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

Вариант постановки №3 (совокупное определение концентрации анти-РСД-IgG и индекса их авидности

В данном варианте постановки используются контроли и калибровочные образцы: ПК, ОК, К1-К5, $ВА_к$ и $НК_к$.

3.3.3 Для образцов сыворотки/плазмы крови готовят разведение в планшете полистироловом для предварительного разведения образцов. Исходя из количества исследуемых образцов отбирают необходимое количество стрипов и в каждую лунку планшета вносят 90 мкл РПРО (**№9**) +10 мкл исследуемого образца, пипетируют. При разведении образца цвет РПРО должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать ложный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

3.4.3 Контроли и калибровочные образцы **(все, представленные в наборе)** вносят по 100 мкл из расчета того, что калибровочные образцы К1-К5 и ПК вносятся в 1 лунку, $ВА_к$, $НА_к$ и ОК вносятся в 2 лунки.

Например: -в лунки А1-Е1 последовательно вносят К1-К5; -в лунку F1 вносят ПК;-в лунки G1-H1 вносят ОК;-в лунки А2-А3 вносят $ВА_к$;-в лунки В2-В3 вносят $НА_к$;

Рекомендуемая схема внесения калибровочных и контрольных образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	К1	$ВА_к$	$ВА_к$	Обр7	Обр7	Обр15	Обр15	Обр23	Обр23	Обр31	Обр31	Обр39
B	К2	$НА_к$	$НА_к$	Обр8	Обр8	Обр16	Обр16	Обр24	Обр24	Обр32	Обр32	Обр39
C	К3	Обр1	Обр1	Обр9	Обр9	Обр17	Обр17	Обр25	Обр25	Обр33	Обр33	Обр40
D	К4	Обр2	Обр2	Обр10	Обр10	Обр18	Обр18	Обр26	Обр26	Обр34	Обр34	Обр40
E	К5	Обр3	Обр3	Обр11	Обр11	Обр19	Обр19	Обр27	Обр27	Обр35	Обр35	Обр41
F	ПК	Обр4	Обр4	Обр12	Обр12	Обр20	Обр20	Обр28	Обр28	Обр36	Обр36	Обр41
G	ОК	Обр5	Обр5	Обр13	Обр13	Обр21	Обр21	Обр29	Обр29	Обр37	Обр37	Обр42
H	ОК	Обр6	Обр6	Обр14	Обр14	Обр22	Обр22	Обр30	Обр30	Обр38	Обр38	Обр42

3.5.3 В остальные лунки вносят по 90 мкл РРКО **(№10)** и по 10 мкл предварительно разведенных в 10 раз образцов **в 2 повторах,** аналогично внесению контрольных образцов. Тщательно перемешивают. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

3.6.3 Стрипы накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^0$С. 3.6.3 Промывают планшет 5 раз рабочим промывочным раствором. Для этого предварительно удаляют содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором. Затем в каждую лунку вносят не менее 0,35 мл рабочего промывочного раствора, выдерживают 30 сек, удаляют содержимое и повторяют эту процедуру еще 4 раза.

3.7.3 В стрип №1, за исключением лунки Н1, стрип №2 и далее в четные стрипы (№№ 4, 6 и до 10 стрипа включительно) вносят по 100 мкл РС **(№7)**. В лунку Н1 и в нечетные стрипы (№№ 3, 5 и до 11 стрипа включительно) вносят по 100 мкл ХА **(№6)**. В лунки стрипа №12 растворы РС и ХА рекомендуется вносить поочередно: А12, С12, Е12, G12 – по 100 мкл РС; В12, D12, F12, Н12 – по 100 мкл ХА.

рипы накрывают пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 15 мин при температуре $(37 \pm 1)^0$С. Промывают 5 раз рабочим промывочным раствором (см. п. 3.6).

3.8.3 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата. Инкубируют 30 мин при $(37 \pm 1)^0$С. Промывают 5 раз рабочим промывочным раствором (см. п. 3.4).

3.9.3 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл ТМБ.

3.10.3 Планшет выдерживают в течение 10 мин от начала внесения ТМБ в защищенном от света месте при комнатной температуре.

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

3.11.3 Во все лунки планшета вносят по 0,1 мл стоп-реагента для остановки цветной реакции.

4 Учет и интерпретация результатов

Через 2-3 мин после внесения стоп-реагента проводят спектрофотометрию проб: длина волны измерения – 450 нм, фоновая – 630 нм.

4.1 Определение концентрации анти-РСД-IgG:

Значение показателя оптической плотности (ПОП) для ОК должно быть не более 0,100

Значение ПОП К1-1000BAU должно быть не менее 1,500

При соответствии данных ПОП для ОК и К1- BAU/ml далее расчет производят в соответствии с калибровочной кривой, где по оси абсцисс (х) приведены значения концентрации IgG (BAU/ml), по оси ординат (у) – значения ПОП (450/630).

При ПОП ОК ≤ 0,100 значение К1-1000BAU должно быть ≥ 1,500 ПОП

ПОП К1-1000BAU/ml> К2-500BAU/ml> К3-250BAU/ml> К4-100BAU/ml> К5-10BAU/ml с соблюдением коэффициента регрессии для калибровочной кривой не менее 0,9

Результат считают **отрицательным**, если в соответствии с калибровочной кривой концентрация составила **< 10,0 BAU/ml** в лунке с исследуемым образцом (ПОП иссл.) Результат считают **положительным**, если ПОП иссл. ≥ **10 BAU/ml**

Если ПОП иссл. > К1-1000 BAU/мл при детекции результатов на основной длине волны 450 нм, результат анализа следует выражать как «более 1000 BAU/ml».

Схема учета и интерпретации результатов

ПОП	**Результат**
ПОП иссл. < 10 BAU/ml	**Отрицательный**, образец оценивается как не содержащий иммуноглобулины G к RBD SARS-CoV-2
ПОП иссл. ≥ 10 BAU/ml	**Положительный**, образец оценивается как содержащий иммуноглобулины G к RBD SARS-CoV-2, с количественным определением IgG в анализируемой пробе

4.2 Определение индекса авидности (ИА) анти-РСД-IgG:

Проведение анализа считается достоверным при соблюдении следующих условий:

Значение ПОП в лунке с $ВА_к$ с РС должно быть не менее 1,000.

Значение ПОП в лунке с $НА_к$ с РС должно быть не менее значения ОП ОК+0,200

Значение ПОП ОК в лунке с РС не должно превышать 0,100.

Индекс авидности ИА(%) для $ВА_к$, рассчитанный по нижеприведенной формуле, должен быть не менее 50%.

$$ИА(ВАк) = \frac{ПОП(ВАк)\text{ в лунке с ХА}}{ПОП(ВАк)\text{ в лунке с РС}} * 100\%$$

Индекс авидности ИА(%) для $НА_к$, рассчитанный по нижеприведенной формуле, должен быть не более 30%.

$$ИА(НАк) = \frac{ПОП(НАк)\text{ в лунке с ХА}}{ПОП(НАк)\text{ в лунке с РС}} * 100\%$$

-Для исследуемого образца не устанавливают индекс авидности, если ПОП в лунке с исследуемым образцом, обработанным РС < $ПОП_{крит.}$ (ПОП ОК+0,200).

- При значении ПОП исследуемого образца ≥ $ПОП_{крит.}$ (ПОП ОК+0,200), для него рассчитывают индекс авидности, **в соответствии с формулой, представленной выше**:

- при регистрируемом значении ИА анти-РСД IgG менее **30%** образец считается содержащим антитела **низкой авидности**;

- При регистрируемом значении ИА анти-РСД IgG в диапазоне **31-49%**, образец считается содержащим антитела **средней авидности**;

- При регистрируемом значении ИА анти-РСД IgG равном и более **50%**, образец считается содержащим антитела высокой авидности.

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

Условие для ПОП	ИА, %	Результат
ПОП иссл. < ПОП ОК (в лунке с РС) +0,200	-	**не устанавливают**
ПОП иссл. ≥ ПОП ОК (в лунке с РС) +0,200	**<30%**	образец оценивается как содержащий иммуноглобулины G к RBD SARS-CoV-2 **низкой авидности**
	31-49%	образец оценивается как содержащий иммуноглобулины G к RBD SARS-CoV-2 **средней авидности**
	≥ 50%	образец оценивается как содержащий иммуноглобулины G к RBD SARS-CoV-2 **высокой авидности**

КРАТКАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИФА «SARS-CoV-2-РСД-ИФА-QA-G»

Прежде, чем пользоваться данной схемой, необходимо внимательно ознакомиться со всей инструкцией к набору.

ЭТАП	Вариант постановки	Наименование операции	Время и температура инкубации
1	**№1/2/3**	Предварительное разведение исследуемых образцов 90 мкл РПРО **(№9)** + 10 мкл исследуемого образца	
2	**№1**	100 мкл К1-К5 **(№3)** –1 лунку каждый 100 мкл ПК **(№1)** – 1 лунка 100 мкл ОК **(№2)** – 2 лунки 90 мкл РРКО **(№10)** + 10 мкл предварительно разведенного образца – 1 повтор	**30 мин** при 37°С
	№2	100 мкл $ВА_к$ **(№4)** – 2 лунки 100 мкл $НА_к$ **(№5)** – 2 лунки 100 мкл ОК **(№2)** – 2 лунки 90 мкл РРКО **(№10)** + 10 мкл предварительно разведенного образца – 2 повтора	
	№3	100 мкл К1-К5 **(№3)** –1 лунку каждый 100 мкл ПК **(№1)** – 1 лунка 100 мкл ОК **(№2)** – 2 лунки 100 мкл $ВА_к$ **(№4)** – 2 лунки 100 мкл $НА_к$ **(№5)** – 2 лунки 90 мкл РРКО **(№10)** + 10 мкл предварительно разведенного образца – 2 повтора	
	№1/2/3	Промыть промывочным раствором ФСТБ 5 раз	
3	**№2/3**	100 мкл РС (№7) – в 1 повтор контролей и исследуемых образцов 100 мкл ХА (№6) – в 1 повтор контролей и исследуемых образцов, за исключением К1-К5 и ПК	**15 мин** при 37°С
	№2/3	Промыть промывочным раствором ФСТБ 5 раз	
4	**№1/2/3**	100 мкл рабочего раствора конъюгата	**30 мин** при 37°С

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

	№1/2/3	Промыть промывочным раствором ФСТБ 5 раз	
5	**№1/2/3**	100 мкл ТМБ **(№8)**	**10 мин** от начала внесения в защищенном от света месте при комнатной температуре
6	**№1/2/3**	100 мкл стоп-реагента **(№9)**	
7	**№1/2/3**	Провести спектрофотометрию проб: длина волны измерения – 450 нм, фоновая - 630 нм.	

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Сероконверсия в отношении IgG к SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 начинает регистрироваться, как правило, на 7 – 10 сутки с момента появления клинических симптомов, на 16 сут. IgG обнаруживаются у 99% пациентов, затем количество антител достигает максимума на 28-49 сутки. В связи с этим возможно получение ложноотрицательных результатов при исследовании проб, взятых в серонегативный период (до 10-14 суток с момента появления клинических симптомов). Ложноотрицательный результат может быть получен также вследствие индивидуальных особенностей иммунного ответа, у пациентов с иммунодефицитами.

РСД S белка разных геновариантов SARS-CoV-2 отличается выраженной антигенной вариабельностью, что обуславливает ограниченную кросс-реактивность IgG к разным вариантам вируса. В данном аспекте, результаты, полученные с использованием данной тест-системы, могут в значительной степени отличаться от другого коммерческого аналога.

Для установления диагноза COVID-19 результаты серологического теста необходимо учитывать в комплексе с другими данными, включающими результаты ПЦР и клинической диагностики.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Линейность в пределах 90-110% показана для диапазона концентраций анти-РСД-IgG от 100 BAU/ml до 1000 BAU/ml.

Точность измерения

Точность измерения находилась в диапазоне 91%-113% при тестировании стандартных внутрипроизводственных панелей сывороток, содержащих (20 проб) и не содержащих (20 проб) анти-РСД-IgG антитела к SARS-CoV-2.

Диапазон обнаружения

Рабочий диапазон определения концентрации анти-РСД-IgG составляет от 10 до 1000 BAU/ml.

Индекс авидности анти-РСД-IgG в пределах 1-30% определен как низкий, в пределах 31-49% – как средний, в пределах 50-100% – как высокий.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации при оценке внутритестовой воспроизводимости на предварительно охарактеризованных образцах биологического материала не превышал 4,6%.

Коэффициент вариации при оценке межтестовой воспроизводимости на предварительно охарактеризованных образцах биологического не превышал 8,1%.

Чувствительность

Чувствительность набора составила 100% при тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток, содержащих анти-РСД-IgG антитела к SARS-CoV-2 (20 проб).

При тестировании 28 образцов сывороток пациентов с диагнозом COVID-19, проходящих лечение в городской клинической инфекционной больнице г. Минска, анти-РСД-IgG к SARS-CoV-2 были выявлены у 100% пациентов.

Специфичность

Специфичность набора при тестировании стандартной внутрипроизводственной панели сывороток, не содержащих анти-РСД-IgG к SARS-CoV-2 (20 проб), составила 100%.

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

При тестировании с использованием набора 50 образцов сывороток здоровых доноров, полученных до пандемии (январь-август 2019 г.), для всех исследуемых сывороток был получен отрицательный результат.

В исследованиях сывороток крови, содержащих антитела к другим респираторным вирусам, в том числе – коронавирусу человека NL63/229E, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна-Барр, ВГЧ 6, энтеровирусам, с использованием набора был получен отрицательный результат.

Достоверность определения авидности IgG

При тестировании образцов биологического материала (сыворотки/плазмы крови человека, n=20), совпадение диапазонов значения индекса авидности при тестировании набором и коммерческим аналогом составило 100%.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора реагентов 12 месяцев с даты изготовления.

Хранение набора осуществляют при температуре от плюс 2 до плюс 8ºС в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности. Транспортирование набора реагентов осуществляют при температуре от плюс 2 до плюс 8ºС.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующий лабораторией
инфекций с природным резервуаром,
д.м.н., проф. _____ Т. В. Амвросьева

Ведущий научный сотрудник
лаборатории инфекций
с природным резервуаром, к.б.н. _____ Н. В. Поклонская

Научный сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром _____ И. В. Бельская

Научный сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром _____ З.Ф. Богуш

Научный сотрудник лаборатории
инфекций с природным резервуаром _____ О.Н. Казинец

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