

«25» мая 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM
Тест-система иммуноферментная для выявления IgM
к нуклеокапсидному антигену коронавируса SARS-CoV-2

REF T1-26M01, T1-26M01C, T1-26M02, T1-26M02C, T1-26M05, T1-26M05C

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для качественного выявления IgM антител к нуклеокапсидному антигену коронавируса SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Анализ может быть проведен как с использованием стандартного оборудования для ИФА, так и автоматических иммуноферментных анализаторов открытого типа (с использованием валидированного протокола постановки анализа).

2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

SARS-CoV-2 - одноцепочечный РНК-вирус семейства Coronaviridae, рода бета-коронавирусов 2В (Beta-CoV). Клинические проявления заболевания варьируют от легкой формы (лихорадка, кашель, усталость, потеря обоняния, одышка) до критического состояния организма (острый респираторный дистресс-синдром). SARS-CoV-2 состоит из 16 неструктурных и 4 структурных белков - антиген шипа S (spike protein), оболочечный антиген E (envelope protein), мембранный антиген M (membrane glycoprotein) и нуклеокапсидный антиген NP (nucleocapsid protein). Антиген S состоит из двух субъединиц S1 и S2: S1 содержит рецептор-связывающий домен (RBD) для связывания с рецептором клетки-мишени³ и S2 для слияния с мембраной клетки-мишени. RBD имеет высокую аффинность к ACE2 рецептору, что приводит к более высокой контагиозности SARS-CoV-2 (в 100-1000 раз выше SARS-CoV). NP является иммуногенным и консервативным антигеном⁴, поэтому его рекомбинантный аналог часто используется в серологических тестах, в частности ИФА.

На сегодняшний день для диагностики COVID-19 используют молекулярный тест выявления вирусной РНК - метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Но существует много случаев получения ложноотрицательных результатов тестирования в ПЦР образцов от лиц с типичными симптомами COVID-19¹. Одной из причин получения ложноотрицательных результатов в ПЦР является некорректный забор материала или его транспортирование². Кроме того, ПЦР очень дорогостоящий и длительный анализ. В связи с этим при диагностике вместе с ПЦР применяют ИФА для выявления специфических антител к SARS-CoV-2 или его антигенов.

Антитела IgA и IgM вырабатываются в организме на первых этапах после инфицирования и появляются в крови на 3-6 день после появления симптомов заболевания. IgA, которые присутствуют в тканях слизистой, формируют местный иммунитет и играют решающую роль, когда заболевание протекает бессимптомно или в легкой форме, такие лица могут быть вирусоносителями и опасными для окружающих. Антитела IgG обнаруживаются в крови больных обычно в течение первых двух недель после появления симптомов, достигая максимума на 28 сутки, при этом уровень IgM снижается. Установлено, что уровень IgG держится в течение нескольких месяцев, защищая от повторного заражения.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Принцип анализа основан на методе «IgM-захвата» твердофазного ИФА и является двухстадийной процедурой.

При внесении в лунки исследуемого образца все IgM, присутствующие в образце, связываются с моноклональными антителами на твердой фазе, образуя комплексы анти-IgM МКАТ-IgM. На следующем этапе IgM к антигенам SARS-CoV-2 выявляют пероксидазным конъюгатом. После отмывания несвязанных компонентов в лунки вносят ТМБ субстрат. Пероксидазную реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации IgM к SARS-CoV-2 в образцах.

4. СОСТАВ И ФОРМА ВЫПУСКА

Реагент	▽ 480	▽ 192	▽ 96
MCPL Иммуносорбент Полистироловый 96-луночный планшет в вакуумированном пакете из ламинированного алюминия с замком Ziploc, в лунках которого сорбированы моноклональные антитела к IgM человека. Готов к использованию	5 шт.	2 шт.	1 шт.
CON 11x KK Концентрат конъюгата (11x) Рекомбинантные антигены SARS-CoV-2, конъюгированные с пероксидазой хрена, консервант 0,4% ProClin™300 [красный]	1×7 мл	1×2,8 мл	1×1,5 мл
CONTROL + ПК Положительный контроль Рекомбинантный белок G Streptococcus, конъюгированный с пероксидазой хрена, консервант 0,4% ProClin™300 [от бесцветного до светло-желтого]. Готов к использованию. Реагент не содержит продукты крови от больных COVID-19	1×1,5 мл	1×0,8 мл	1×0,6 мл
CONTROL – ОК Отрицательный контроль Инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к SARS-CoV-2, ВИЧ-1/2, вирусу гепатита С и T.pallidum. Консерванты 0,2% ProClin™300 и 0,099% азид натрия [светло-желтый]. Готов к использованию.	1×3 мл	1×1,6 мл	1×1,2 мл
WS 26X КПР Концентрат промывочного раствора (26x) Концентрат солевого буфера с детергентом [бесцветный, допускается расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании]	2×180 мл	2×75 мл или 1×150 мл	1×80 мл
SAMP-DIL РРС Раствор для разведения сывороток Белково-солевой буфер, содержащий детергент и консервант 0,4% ProClin™300 [фиолетовый]. Готов к использованию	1×50 мл	1×24 мл	1×14 мл
CON-DIL РРК Раствор для разведения конъюгата Белково-солевой буфер, содержащий консервант 0,4% ProClin™300 [красный]. Готов к использованию	1×70 мл	1×28 мл	1×15 мл
TMB SUBS ТМБ-субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в растворе, содержащем перекись водорода [бесцветный]. Готов к использованию	1×60 мл	1×24 мл	1×12 мл
STOP Стоп-реагент Раствор серной кислоты [бесцветный]. Готов к использованию	1×60 мл	1×28 мл	1×14 мл
SEAL Клейкая пленка	15 шт.	6 шт.	3 шт.
Инструкция по использованию	1 шт.	1 шт.	1 шт.

По желанию заказчика тест-системы могут дополнительно комплектоваться ванночками и флаконами для реагентов, наконечниками к автоматическим пипеткам и пр.

ФОРМА ВЫПУСКА - тест-система

REF	▽ *	Комплектация
T1-26M01, T1-26M01C**	96	1 стриповый планшет, 12 постановок ИФА: 1 постановка – 8 лунок
T1-26M02	192	2 стриповых планшета, 12 постановок ИФА: 1 постановка – 16 лунок
T1-26M02C		2 стриповых планшета, 24 постановки ИФА: 1 постановка – 8 лунок
T1-26M05	480	5 стриповых планшетов, 15 постановок ИФА: 1 постановка – 32 лунки
T1-26M05C		5 стриповых планшетов, 60 постановок ИФА: 1 постановка – 8 лунок

* включая контроли

** планшет с разборными стрипами с возможностью отделения каждой лунки

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- спектрофотометр плащечного типа (ридер) в двухволновом режиме (450нм/620нм);
- промыватель планшетов (вошер);

- термостат на $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- автоматические одноканальные и многоканальные пипетки переменного объема от 5 до 1000 мкл и наконечники к ним;
- таймер.
- вода дистиллированная или деионизированная;
- перчатки медицинские одноразовые;
- дезинфицирующие средства;
- спирт этиловый, 70-76%;
- фильтровальная бумага;
- мерный стакан или цилиндр, 1000 мл;
- ванночки для реагентов;
- контейнеры для потенциально инфекционных отходов.

6. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

- Тест-система предназначена только для профессионального использования квалифицированным лабораторным персоналом.
- Все реагенты тест-системы предназначены для диагностики «in vitro».
- При работе с тест-системой использовать средства индивидуальной защиты: спецодежду и одноразовые медицинские перчатки, и тщательно мыть руки после работы с ней.
- Сыворотка/плазма крови человека, использованная для приготовления отрицательного контроля, инактивирована нагреванием, проверена и определена как не содержащая HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1 и антитела к SARS-CoV-2, ВИЧ-1/2, гепатиту С и T.pallidum. С исследуемыми образцами и отрицательным контролем необходимо обращаться как с потенциально инфекционным материалом, поскольку ни один из известных методов тестирования не может гарантировать 100% выявления инфекционных агентов.
- Не пипетировать растворы ртом.
- Избегать контакта хромогена и стоп-реагента с кожей и слизистыми оболочками.
- Не допускать проливания образцов и растворов, которые их содержат.
- Место проливания образца обрабатывать 70-76% этиловым спиртом. Если пролита кислота, сначала нейтрализовать ее бикарбонатом натрия и вытереть фильтровальной бумагой. Материалы, с помощью которых проводилась очистка, поместить в контейнер для инфекционных отходов.
- Инструменты, оборудование и рабочие поверхности обрабатывать 70-76% этиловым спиртом до и после работы.
- Жидкие потенциально инфекционные отходы обеззараживают дезинфицирующими средствами, разрешенными МЗ для обеззараживания жидких отходов, согласно инструкции по их применению.
- Твердые потенциально инфекционные отходы обеззараживают автоклавированием в течение 1 часа при $(124-128)^\circ\text{C}$ при давлении 0,15 МПа (1,5 атм). Не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия.



Внимание

КК, ПК, ОК, РРС и РПК содержат ProClin™300 в качестве консерванта

Н-фразы

H317 - Может вызывать аллергическую кожную реакцию

Р-фразы

R261 – Избегать вдыхания паров в распылённом состоянии

R272 – Не выносить загрязнённую одежду с места работы

R280 - Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица

R302+R352 - ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды

R333+R313 - При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу

R362+R364 - Снять загрязнённую одежду и промыть её перед повторным использованием

R305+R351+R338 - ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.

R501 - Утилизировать содержимое/контейнер в пункте сбора опасных или специальных отходов согласно локальным, региональным, национальным и/или международным нормам

• Дополнительную информацию см. в Паспортах безопасности, которые предоставляются по запросу.

7. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

Достоверность результатов зависит от корректного выполнения следующих правил:

- Не использовать тест-систему после окончания срока годности.
- Не смешивать реагенты тест-систем разных серий.

- Допускается использовать **неспецифические реагенты КПР, ТМБ-субстрат, стоп-реагент для наборов разных серий** тест-системы DIA[®]-SARS-CoV-2-NP-IgM.
- Не использовать реагенты с нарушением герметичности упаковки.
- Температура в помещении, где проводится анализ, должна быть в пределах (18-25)°C.
- Флаконы с реагентами закрывать крышками сразу после использования.
- Тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.
- Для приготовления реагентов использовать одноразовую посуду или стеклянную посуду, тщательно вымытую и сполоснутую дистиллированной водой.
- Использовать новый одноразовый наконечник для внесения каждого образца и реагента.
- Осторожно пипетировать раствор в лунках не допуская пенообразования.
- Не допускать подсыхания лунок на всех этапах проведения анализа.
- При проведении анализа использовать только поверенное и исправное оборудование.
- Не проводить анализ в присутствии паров перекиси водорода, кислот, щелочей, альдегидов, хлорсодержащих соединений и пыли, не допускать контакта реагентов с металлами, поскольку это отрицательно влияет на ферментативную активность конъюгата.
- ТМБ перед использованием должен быть бесцветным, при наличии окрашивания его необходимо заменить новым.
- Не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и ТМБ.
- Избегать попадания прямого солнечного света на рабочую поверхность при проведении анализа.
- Анализ в тест-системе может быть проведен с использованием различных автоматических анализаторов открытого типа. Процедура анализа должна быть обязательно валидирована для разных моделей анализаторов.
- При использовании анализаторов с игольчатой системой разнесения (например, анализатор ChemWell[®] 2910 Combi, компании Awareness Technology, Inc.) во избежание переноса материала положительных образцов в лунки с отрицательными образцами, рекомендуется промывать систему разнесения реагентов раствором «Клин» производства ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД».
- Не изменять процедуру анализа.

8. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

- С лабораторными отходами, полученными при тестировании образцов с COVID-19, следует обращаться как с другими биологически опасными отходами в лаборатории.
- После использования тест-системы все жидкие и твердые потенциально инфекционные отходы обеззараживать согласно разделу «Меры безопасности».
- Неиспользованные тест-системы перед утилизацией разукomплектовать. Отрицательный контроль обеззараживать как потенциально опасные инфекционные отходы. Упаковку утилизируют как бытовые отходы.
- При утилизации стоп-реагента соблюдать правила безопасности при работе с кислотами.
- Отходы утилизируют согласно требованиям местного законодательства.

9. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Тест-система предназначена для тестирования образцов сывороток или плазмы крови, в том числе полученных с помощью антикоагулянта (K₂ЭДТА, K₃ЭДТА, цитрата натрия, гепарина лития и т.д.) или активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него).

Образцы могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8)°C. Допускается хранение образцов при температуре ниже минус 20°C в течение трех месяцев, при температуре минус 70°C в течение двух лет.

Допускается не более трех циклов замораживания/оттаивания образцов. Размороженные образцы после оттаивания обязательно перемешивают для достижения однородности. Для предупреждения осаждения фибрина плазму необходимо быстро разморозить в течение нескольких минут при температуре (38-40)°C. Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 минут при 1900 g (2500-3000 об/мин).

Непригодны для анализа образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом.

10. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВКЕ

Процедуру промывки выполнять в соответствии с требованиями инструкции. Некачественное промывание планшета может привести к получению некорректных результатов.

При каждой промывке выполнять следующие операции:

- полностью удалить содержимое лунок;
- полностью заполнить лунки промывочным раствором (350-400 мкл в лунку), без переполнения и

- перетекания жидкости в соседние лунки;
- выдержать раствор в лунках в течение 40 секунд;
- полностью удалить раствор из лунок.

На поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

Для промывания планшета рекомендуется использовать вошер, работающий в автоматическом режиме «Overflow». При отсутствии вошера допускается промывка планшета многоканальной автоматической пипеткой.

11. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Реагенты тест-системы и образцы перед анализом должны быть комнатной температуры (18-25)°C.

11.1 Подготовка иммуносорбента

Разорвать пакет, отобрать необходимое количество стрипов/лунок и оставить их в рамке, остальные стрипы немедленно вложить в пакет и плотно закрыть замок Ziploc.

11.2 Подготовка промывочного раствора

Содержимое одного флакона **КПР** интенсивно взболтать. Если **КПР** содержит кристаллы, прогреть флакон при (35-37) C до их полного растворения. Развести **КПР** (26х) дистиллированной водой (см. таблицу), перемешать.

11.3 Подготовка раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата готовят перед использованием. Развести в чистом флаконе **КК** (11х) раствором **РРК** (см. таблицу). Тщательно перемешать, не допуская пенообразования.

12. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

12.1 Хранение тест-системы

Тест-систему хранят и транспортируют при температуре (2-8)°C. Не замораживать. Разрешается транспортирование при температуре (9-25)°C в течение десяти суток.

Срок годности тест-системы 14 месяцев.

12.2 Хранение реагентов после разведения

Рабочий промывочный раствор стабилен в течение 1 месяца при (2-8)°C или 36 часов при (18-25)°C при условии хранения в чистой, плотно закрытой емкости.

Рабочий раствор конъюгата стабилен в течение 20 часов при (2-8)°C или 8 часов при (18-25)°C при условии хранения в чистой, плотно закрытой емкости в защищенном от света месте.

12.3 Хранение реагентов после первичного вскрытия упаковки

После первичного вскрытия упаковки все реагенты стабильны в течение срока годности тест-системы при условии хранения в плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8)°C в защищенном от света месте.

В ходе проведения анализа допускается хранение реагентов тест-системы в течение 3 часов при температуре (18-25) C в защищенном от света месте.

13. РАСХОД РЕАГЕНТОВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Кол-во стрипов	Промывочный раствор		Раствор конъюгата		ТМБ-субстрат, мл	Стоп-реагент, мл
	КПР, мл	Дист.вода, мл	КК, мкл	РРК, мл		
1	6	150	100	1	1	1
2	12	300	200	2	2	2
3	18	450	300	3	3	3
4	24	600	400	4	4	4
5	30	750	500	5	5	5
6	36	900	600	6	6	6
7	42	1050	700	7	7	7
8	48	1200	800	8	8	8
9	54	1350	900	9	9	9
10	60	1500	1000	10	10	10
11	66	1650	1100	11	11	11
12	72	1800	1200	12	12	12

14. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Продолжительность анализа – 2 часа; объем исследуемого образца – 10 мкл

- Внести в лунки по **90 мкл РРС**.
- Внести в лунки по **10 мкл исследуемых образцов и контролей** (контроли обязательно включают в каждую постановку ИФА и вносят в первые лунки первого ряда в последнюю очередь):
 - если используются **1-2 стрипа**: **ПК - 1 лунка, ОК - 2 лунки**;
 - если используются **3 и более стрипов**: **ПК – 2 лунки, ОК – 3 лунки**.
 - в остальные лунки внести исследуемые образцы.

При внесении образца сыворотки изменяется цвет раствора в лунке, что обеспечивает визуализацию внесения исследуемого образца в лунку

- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при температуре **(37±2)°C** в течение **60 минут**.
- Промыть планшет **4 раза промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **100 мкл раствора конъюгата**.
- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при температуре **(37±2)°C** в течение **30 минут**.
- Промыть планшет **6 раз промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **100 мкл ТМБ субстрата**.
- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при температуре **(18-25)°C** в темном месте в течение **30 минут**.
- Внести в лунки по **100 мкл стоп-реагента** (в той же последовательности внесения, что и ТМБ субстрат).
- Не позже чем через **2-3 минуты** измерить ОП в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм). Визуальный учет результатов не допускается.

15. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитать среднее значение ОП **ОК – ОК_{ср}**.
Исключить значение **ОК** которое больше 0,1 или более чем в два раза превышает ОК_{ср}, и пересчитать ОК_{ср} по оставшимся значениям **ОК***.
- Проведение анализа считают достоверным, если ОК_{ср} не больше 0,1, а ОП **ПК** не меньше 0,6.

**Значения ОП ОК и исследуемых образцов меньше 0,00 (со знаком «-») при расчетах ГЗ и анализе результатов считать равными нулю*

- Рассчитать граничное значение (ГЗ), прибавляя константную величину к ОК_{ср}:

$$\text{ГЗ} = \text{ОК}_{\text{ср}} + 0,2$$

- Результат анализа считается **отрицательным**, если ОП исследуемого образца < ГЗ.
- Результат анализа считается **положительным**, если ОП исследуемого образца ≥ ГЗ.
- Результат анализа можно интерпретировать при помощи коэффициента позитивности (КП), который рассчитывают по формуле: $\text{КП} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ГЗ}}$
- Результат анализа считается **отрицательным**, если КП < 1.
- Результат анализа считается **положительным**, если КП ≥ 1.
- Образцы, давшие положительный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках тест-системы:
 - образцы положительные в одной и более лунках следует считать положительными;
 - образцы отрицательные в двух и более лунках следует считать отрицательными.

Все образцы, которые при повторном анализе выявлены положительными, рекомендуется тестировать в тест-системе для выявления суммарных антител, например, DIA®-SARS-CoV-2, производства ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД».

16. КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

16.1 Точность

Повторяемость (repeatability) рассчитывали с использованием 8 положительных образцов, которые тестировали в 10 повторах 1 исполнитель с использованием одного комплекта оборудования:

Образец	Коэффициент вариации (CV,%)
14 Б-9	1,4
17 Б-9	1,5
19 Б-9	1,3
20 Б-9	0,7
22 Б-9	2,4
14 Б-4	2,3
67 Б-4	0,7
73 Б-4	0,8

Воспроизводимость (reproducibility) рассчитывали с использованием 3 положительных образцов, которые тестировали в 5 повторах 3 исполнителя в течение 3 дней с использованием разных комплектов оборудования.

Образец	CV, %
1	1,5
2	1,6
3	1,5
CV между днями	3,8

16.2 Кросс-реактивность и интерференция

Влияние кросс-реактивных и интерферирующих веществ на результат тестирования в DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM оценивали с использованием образцов, приведенных в таблице ниже. Возможна незначительная кросс-реактивность в отношении ВИЧ-1/2, EBV IgM и патогенных коронавирусов человека HKU1 (IgM) и NL63 (IgG). Наличие в исследуемых образцах маркеров других исследованных инфекций и интерферирующих веществ не должно влиять на результат тестирования в тест-системе DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM.

Категория	Количество образцов	Результат в DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM	
		Положительный	Отрицательный
CMV IgG	13	0	13
CMV IgM	3	0	3
EBV IgG	4	0	4
HCV	23	0	23
T. pallidum	15	0	15
HBsAg	34	0	34
ВИЛ-1/2	46	1	45
Беременные	15	0	15
Лечение соответствующими препаратами*	1	0	1
Ревматоидный фактор	6	0	6
HSV 1/2 IgM	29	0	29
VZV IgG	2	0	2
VZV IgG+IgM	1	0	1
ANA	10	0	10
EBV IgM	25	1	24
MERS	1	0	1
Chlamydia pneumonia IgA	1	0	1
Вирус гриппа типы A+B IgG	1	0	1
Образцы от вакцинированных против клещевого энцефалита	20	0	20
HCoV-HKU1 IgG	5	0	5
HCoV-HKU1 IgM	5	1	4
HCoV-NL63 IgG	5	1	4
HCoV-OC43 IgG	5	0	5
HCoV-229E IgG	5	0	5

* Амоксицилин 875 мг / клавуланатид 125 мг

16.3 Чувствительность и специфичность для стандартных панелей

Чувствительность и специфичность тест-системы DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM при тестировании стандартных панелей сывороток составляет 100%:

- При проведении верификационных испытаний в ГУ «Центр общественного здоровья МЗ Украины» с использованием DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM и стандартной панели сывороток «СПК-SARS-CoV-2-IgM», содержащих и не содержащих специфических IgM антител к вирусу SARS-CoV-2, все положительные сыворотки панели (8 образцов) в тест-системе DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM были выявлены положительными, а все отрицательные сыворотки панели (9 образцов) были выявлены отрицательными.
- При тестировании двух стандартных внутрипроизводственных панелей сывороток ПП-26М ВПП-01/1 и ПП-26М ВПП-02, содержащих и не содержащих IgM к вирусу SARS-CoV-2, все положительные сыворотки панели (всего 22 образца) в тест системе DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM были выявлены положительными, а все отрицательные сыворотки панели (всего 10 образцов) были выявлены отрицательными.
- При тестировании верификационной панели «Anti-SARSCoV-2 Verification Panel for Serology Assays», (NIBSC code: 20/B770, производства NIBSC, Великобритания), состоящей из 23 положительных на антитела к SARS-CoV-2 образца плазмы от реконвалесцентов и 14 SARS-CoV-2 отрицательных образцов, тест система DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM выявила образцы как приведено в таблице ниже.

Результаты тестирования панели Anti-SARSCoV-2, NIBSC				
Количество образцов панели	DiaSorin SARS-CoV-2 IgM (CE*, EUA**)	Fortress COVID-19 IgM (CE)	DiaPro COVID-19 IgM (CE)	DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM
Положительные, 23	15(+)/8(-)	17(+)/(6-)	19(+)/(4-)	15(+)/8(-)
Отрицательные, 14	14(-)	13(-)/1(+)	14(-)	14(-)

* Разрешение на использование в странах Европейского Союза («СЕ-маркировка»)

** Разрешение на использование в чрезвычайных ситуациях в США, выдано Администрацией по пищевым продуктам и медикаментам (FDA)

Из данных таблицы видно, что тест-система DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM демонстрирует результаты, сопоставимые с результатами тест-систем ведущих производителей.

16.4 Клинические исследования

Чувствительность

При тестировании образцов от 10 человек с подтвержденным в ПЦР диагнозом COVID-19 с длительностью симптомов COVID-19 более 22 дней, полученных из больниц и лабораторий Украины и Германии, чувствительность DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM (% совпадения результатов с ПЦР) составляет 100%.

Специфичность

При тестировании 98 образцов сывороток от здоровых доноров, полученных до пандемии COVID-19 (до ноября 2019) диагностическая (клиническая) специфичность тест-системы DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM составляет 100%.

17. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

В случае ранней инфекции в период сероконверсионного окна, когда антитела отсутствуют или их уровень очень низкий и находится за пределами чувствительности данной тест-системы, результат серологического исследования может быть отрицательным. В этом случае при наличии клинических симптомов заболевания рекомендуется провести повторное обследование пациента в данной тест-системе через несколько дней. Для установления окончательного диагноза необходимо учитывать не только результаты серологического теста, но также данные тестирования в ПЦР, наличие клинических симптомов заболевания и рентгенологические данные обследования легких. Не тестировать пулированные образцы. Производитель не может гарантировать достоверность результатов тестирования таких образцов, так как подобных исследований не проводилось.

К ложноотрицательным и ложноположительным результатам может привести несоблюдение правил подготовки и хранения образцов и грубые нарушения процедуры анализа, установленной производителем.

18. ЛИТЕРАТУРА

1. Juanjuan Zhao, Quan Yuan, Haiyan Wang, Wei Liu, Xuejiao Liao et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. Clinical Infectious Diseases, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>. Published: 28 March 2020

2. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for 2 detecting antibodies against SARS-CoV-2. JCM Accepted Manuscript Posted Online 30 March 2020, J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.00461-20

3. Nisreen M.A. Okba, Marcel A. Müller, Wentao Li, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. Emerging Infectious Diseases, Volume 26, Number 7-July 2020, doi: 10.3201/eid2607.200841

4. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. Journal of medical virology. First published: 07 February 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25702>

КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА

Инкубация с образцами	60 мин, (37±2)°C	90 мкл РРС + 10 мкл образца
↓		
Промывка 4 раза		350-400 мкл промывочного раствора
↓		
Инкубация с конъюгатом	30 мин, (37±2)°C	100 мкл раствора конъюгата
↓		
Промывка 6 раз		350-400 мкл промывочного раствора
↓		
Инкубация с ТМБ субстратом	30 мин, (18-25)°C в темноте	100 мкл ТМБ субстрата
↓		
Остановка реакции		100 мкл стоп-реагента
↓		
Учет результатов	2-3 мин	450/620 нм



ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД»

04123, Украина, г. Киев, Светлицкого, 35.

Тел.: +38(044) 463-0603, +38(044) 434-9128,

+38(067) 343-5993, Факс: +38(044) 463-0602

E-mail: tech@diapr.kiev.ua www.diaproph.com

**Уполномоченный представитель
производителя на принятие
претензий на территории
Республики Беларусь**

ООО «БелФармАйс»

220035, г. Минск, ул. Тимирязева, д.65А, пом.300, каб.3

Тел./факс: +375 29 670 45 80, belfarmice@gmail.com

В случае нарушения предусмотренных производителем условий хранения, транспортировки и процедуры постановки ИФА, претензии рассматриваются как необоснованные.

ПОЯСНЕНИЯ К СИМВОЛАМ



Производитель



Дата изготовления (формат ГГГГ-ММ)



Использовать до (формат ГГГГ-ММ, срок годности до конца указанного месяца)



Количество исследований



Медицинское изделие для диагностики IN VITRO



Температурное ограничение



Номер серии



Каталожный номер



Ознакомление с инструкциями по использованию



Национальный знак соответствия Украины

Редакция №1 от 2021-05 г.

«ЗАВЕРЯЮ»
Председатель Правления
ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД»

А.А. Шевчук
«25» мая 2021 г.

ИД

ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG
Тест-система иммуноферментная для выявления IgG
к нуклеокапсидному антигену коронавируса SARS-CoV-2

REF T1-26G01, T1-26G01C, T1-26G02, T1-26G02C, T1-26G05, T1-26G05C

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для качественного и полуколичественного выявления IgG антител к нуклеокапсидному антигену коронавируса SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Анализ может быть проведен как с использованием стандартного оборудования для ИФА, так и автоматических иммуноферментных анализаторов открытого типа (с использованием валидированного протокола постановки анализа).

2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

SARS-CoV-2 - одноцепочечный РНК-вирус семейства Coronaviridae, рода бета-коронавирусов 2В (Beta-CoV). Клинические проявления заболевания варьируют от легкой формы (лихорадка, кашель, усталость, потеря обоняния, одышка) до критического состояния организма (острый респираторный дистресс-синдром). SARS-CoV-2 состоит из 16 неструктурных и 4 структурных белков – антиген шипа S (spike protein), оболочечный антиген E (envelope protein), мембранный антиген M (membrane glycoprotein) и нуклеокапсидный антиген NP (nucleocapsid protein). Антиген S состоит из двух субъединиц S1 и S2: S1 содержит рецептор-связывающий домен (RBD) для связывания с рецептором клетки-мишени³ и S2 для слияния с мембраной клетки-мишени. RBD имеет высокую аффинность к ACE2 рецептору, что приводит к более высокой контагиозности SARS-CoV-2 (в 100-1000 раз выше SARS-CoV). NP является иммуногенным и консервативным антигеном⁴, поэтому его рекомбинантный аналог часто используется в серологических тестах, в частности ИФА.

На сегодняшний день для диагностики COVID-19 используют молекулярный тест выявления вирусной РНК - метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Но существует много случаев получения ложноотрицательных результатов тестирования в ПЦР образцов от лиц с типичными симптомами COVID-19¹. Одной из причин получения ложноотрицательных результатов в ПЦР является некорректный забор материала или его транспортирование². Кроме того, ПЦР очень дорогостоящий и длительный анализ. В связи с этим при диагностике вместе с ПЦР применяют ИФА для выявления специфических антител к SARS-CoV-2 или его антигенов. Антитела IgA и IgM вырабатываются в организме на первых этапах после инфицирования и появляются в крови на 3-6 день после появления симптомов заболевания. IgA, которые присутствуют в тканях слизистой, формируют местный иммунитет и играют решающую роль, когда заболевание протекает бессимптомно или в легкой форме, такие лица могут быть вирусоносителями и опасными для окружающих. Антитела IgG обнаруживаются в крови больных обычно в течение первых двух недель после появления симптомов, достигая максимума на 28 сутки, при этом уровень IgM снижается. Установлено, что уровень IgG держится в течение нескольких месяцев, защищая от повторного заражения.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Принцип анализа основан на методе твердофазного непрямого ИФА и является двухстадийной процедурой.

При внесении в лунки исследуемых образцов IgG к SARS-CoV-2 связываются с рекомбинантными антигенами SARS-CoV-2, сорбированными на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело, которые на следующем этапе выявляют пероксидазным конъюгатом моноклональных антител к IgG человека. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют ТМБ субстрат. Пероксидазную реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации IgG к SARS-CoV-2 в образцах.

4. СОСТАВ И ФОРМА ВЫПУСКА

Реагент	▽ 480	▽ 192	▽ 96
MCPL Иммуносорбент Полистироловый 96-луночный планшет в вакуумированном пакете из ламинированного алюминия с замком Ziploc, в лунках которого сорбирован рекомбинантный нуклеокапсидный антиген SARS-CoV-2. Готов к использованию	5 шт.	2 шт.	1 шт.
CON 11x KK Концентрат конъюгата (11x) Моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, консервант: 0,4% ProClin™ 300 [красный]	1×7 мл	1×2,8 мл	1×1,5мл
CONTROL + ПК Положительный контроль Моноклональные антитела к SARS-CoV-2, конъюгированные с пероксидазой хрена, в белковом матриксе, консервант 0,4% ProClin™ 300 [от бесцветного до светло-желтого]. Готов к использованию. Реагент не содержит продукты крови от больных COVID-19	1×1,2мл	1×0,8 мл	1×0,5мл
CONTROL – ОК Отрицательный контроль Инактивированная сыворотка крови человека, которая не содержит HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к SARS-CoV-2, ВИЧ-1/2, вирусу гепатита С и T.pallidum, Консерванты: 0,2% ProClin™300 и 0,099% азид натрия [светло-желтый]. Готов к использованию.	1×3 мл	1×1,6 мл	1×1,2мл
WS 26X KPP Концентрат промывочного раствора (26x) Концентрат солевого буфера с детергентом [бесцветный, допускается расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании]	2×180 мл	2×75 мл или 1×150 мл	1×80 мл
SAMP-DIL PPC Раствор для разведения сывороток Белково-солевой буфер, содержащий детергент, блок-компоненты и консервант 0,4% ProClin™ 300 [фиолетовый]. Готов к использованию	1×50 мл	1×24 мл	1×14 мл
CON-DIL PPK Раствор для разведения конъюгата Белково-солевой буфер, содержащий детергент и консервант 0,4% ProClin™300 [красный]. Готов к использованию	1×70 мл	1×28 мл	1×15 мл
TMB SUBS ТМБ-субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в растворе, содержащем перекись водорода [бесцветный]. Готов к использованию	1×60 мл	1×24 мл	1×12 мл
STOP Стоп-реагент Раствор серной кислоты [бесцветный]. Готов к использованию	1×60 мл	1×28 мл	1×14 мл
SEAL Клейкая пленка	15 шт.	6 шт.	3 шт.
Инструкция по использованию	1 шт.	1 шт.	1 шт.

По желанию заказчика тест-системы могут дополнительно комплектоваться ванночками и флаконами для реагентов, наконечниками к автоматическим пипеткам и пр.

ФОРМА ВЫПУСКА - тест-система

REF	▽ *	Комплектация
T1-26G01, T1-26G01C**	96	1 стриповый планшет, 12 постановок ИФА: 1 постановка – 8 лунок
T1-26G02	192	2 стриповых планшета, 12 постановок ИФА: 1 постановка – 16 лунок
T1-26G02C		2 стриповых планшета, 24 постановки ИФА: 1 постановка – 8 лунок
T1-26G05	480	5 стриповых планшетов, 15 постановок ИФА: 1 постановка – 32 лунки
T1-26G05C		5 стриповых планшетов, 60 постановок ИФА: 1 постановка – 8 лунок

* включая контроли

** планшет с разборными стрипами с возможностью отделения каждой лунки

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- спектрофотометр плашечного типа (ридер) в двухволновом режиме (450нм/620нм);
- промыватель планшетов (вошер);

- термостат на $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- термошейкер на 500 об/мин;
- автоматические одноканальные и многоканальные пипетки переменного объема от 5 до 1000 мкл и наконечники к ним;
- таймер.
- вода дистиллированная или деионизированная;
- перчатки медицинские одноразовые;
- дезинфицирующие средства;
- спирт этиловый, 70-76%;
- фильтровальная бумага;
- мерный стакан или цилиндр, 1000 мл;
- ванночки для реагентов;
- контейнеры для потенциально инфекционных отходов.

6. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

- Тест-система предназначена только для профессионального использования квалифицированным лабораторным персоналом.
- Все реагенты тест-системы предназначены для диагностики «in vitro».
- При работе с тест-системой использовать средства индивидуальной защиты: спецодежду и одноразовые медицинские перчатки, и тщательно мыть руки после работы с ней.
- Сыворотка/плазма крови человека, использованная для приготовления отрицательного контроля, инактивирована нагреванием, проверена и считается не содержащей HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1 и антитела к SARS-CoV-2, ВИЧ-1/2, гепатиту С и T.pallidum. С исследуемыми образцами и отрицательным контролем необходимо обращаться как с потенциально инфекционным материалом, поскольку ни один из известных методов тестирования не может гарантировать 100% выявления инфекционных агентов.
- Не пипетировать растворы ртом.
- Избегать контакта хромогена и стоп-реагента с кожей и слизистыми оболочками.
- Не допускать проливания образцов и растворов, которые их содержат.
- Место проливания образца обрабатывать 70-76% этиловым спиртом. Если пролита кислота, сначала нейтрализовать ее бикарбонатом натрия и вытереть фильтровальной бумагой. Материалы, с помощью которых проводилась очистка, поместить в контейнер для инфекционных отходов.
- Инструменты, оборудование и рабочие поверхности обрабатывать 70-76% этиловым спиртом до и после работы.
- Жидкие потенциально инфекционные отходы обеззараживают дезинфицирующими средствами, разрешенными МЗ для обеззараживания жидких отходов, согласно инструкции по их применению.
- Твердые потенциально инфекционные отходы обеззараживают автоклавированием в течение 1 часа при $(124-128)^\circ\text{C}$ при давлении 0,15 МПа (1,5 атм). Не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия.



Внимание

КК, ПК, ОК, РРС и РРК содержат ProClin™300 в качестве консерванта

Н-фразы

H317 - Может вызывать аллергическую кожную реакцию

Р-фразы

R261 – Избегать вдыхания паров в распылённом состоянии

R272 – Не выносить загрязнённую одежду с места работы

R280 - Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица

R302+R352 - ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды

R333+R313 - При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу

R362+R364 - Снять загрязнённую одежду и промыть её перед повторным использованием

R305+R351+R338 - ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать.

Продолжить промывание глаз.

R501 - Утилизировать содержимое/контейнер в пункте сбора опасных или специальных отходов согласно локальным, региональным, национальным и/или международным нормам

- Дополнительную информацию см. в Паспортах безопасности, которые предоставляются по запросу.

7. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

Достоверность результатов зависит от корректного выполнения следующих правил:

- Не использовать тест-систему после окончания срока годности.
- Не смешивать реагенты тест-систем разных серий.

- Допускается использовать **неспецифические реагенты КПР, ТМБ-субстрат, стоп-реагент для наборов разных серий** тест-системы DIA[®]-SARS-CoV-2-NP-IgG.

- Не использовать реагенты с нарушением герметичности упаковки.
- Температура в помещении, где проводится анализ, должна быть в пределах (18-25)°C.
- Флаконы с реагентами закрывать крышками сразу после использования.
- Тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.
- Для приготовления реагентов использовать одноразовую посуду или стеклянную посуду, тщательно вымытую и сполоснутую дистиллированной водой.
- Использовать новый одноразовый наконечник для внесения каждого образца и реагента.
- Осторожно пипетировать раствор в лунках избегая пенообразования.
- Не допускать подсыхания лунок на всех этапах проведения анализа.
- При проведении анализа использовать только поверенное и исправное оборудование.
- Не проводить анализ в присутствии паров перекиси водорода, кислот, щелочей, альдегидов, хлорсодержащих соединений и пыли, не допускать контакта реагентов с металлами, поскольку это отрицательно влияет на ферментативную активность конъюгата.
- ТМБ перед использованием должен быть бесцветным. При наличии окрашивания его необходимо заменить новым.
- Не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и ТМБ.
- Избегать попадания прямого солнечного света на рабочую поверхность при проведении анализа.
- Анализ в тест-системе может быть проведен с использованием различных автоматических анализаторов открытого типа. Процедура анализа должна быть обязательно валидирована для разных моделей анализаторов.
- При использовании анализаторов с игольчатой системой разнесения (например, анализатор ChemWell[®] 2910 Combi, компании Awareness Technology, Inc.) во избежание переноса материала положительных образцов в лунки с отрицательными образцами рекомендуется промывать систему разнесения реагентов раствором «Клин» производства ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД».
- Не изменять процедуру анализа.

8. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

- С лабораторными отходами, полученными при тестировании образцов с COVID-19, следует обращаться как с другими биологически опасными отходами в лаборатории.
- После использования тест-системы все жидкие и твердые потенциально инфекционные отходы обеззараживать согласно разделу «Меры безопасности».
- Неиспользованные тест-системы перед утилизацией разукomплектовать. Отрицательный контроль обеззараживать как потенциально опасные инфекционные отходы. Упаковку утилизируют как бытовые отходы.
- При утилизации стоп-реагента соблюдать правила безопасности при работе с кислотами.
- Отходы утилизируют согласно требованиям местного законодательства.

9. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Тест-система предназначена для тестирования образцов сывороток или плазмы крови, в том числе полученных с помощью антикоагулянта (К₂ЭДТА, К₃ЭДТА, цитрата натрия, гепарина лития и т.д.) или активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него).

Образцы могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8)°C. Допускается хранение образцов при температуре ниже минус 20°C в течение трех месяцев, при температуре минус 70°C в течение двух лет.

Допускается не более трех циклов замораживания/оттаивания образцов. Размороженные образцы после оттаивания обязательно перемешивают для достижения однородности. Для предупреждения осаждения фибрина плазму необходимо быстро разморозить в течение нескольких минут при температуре (38-40)°C. Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 минут при 1900 g (2500-3000 об/мин).

Непригодны для анализа образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом.

10. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВКЕ

Процедуру промывки выполнять в соответствии с требованиями инструкции. Некачественное промывание планшета может привести к получению некорректных результатов.

При каждой промывке выполнять следующие операции:

- полностью удалить содержимое лунок;

- полностью заполнить лунки промывочным раствором (350-400 мкл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- выдержать раствор в лунках в течение 40 секунд;
- полностью удалить раствор из лунок.

На поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

Для промывания планшета рекомендуется использовать вошер, работающий в автоматическом режиме «Overflow». При отсутствии вошера допускается промывка планшета многоканальной автоматической пипеткой.

11. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Реагенты тест-системы и образцы перед анализом должны быть комнатной температуры (18-25)°С.

11.1 Подготовка иммуносорбента

Разорвать пакет, отобрать необходимое количество стрипов/лунок и оставить их в рамке, остальные стрипы немедленно вложить в пакет и плотно закрыть замок Ziploc.

11.2 Подготовка промывочного раствора

Содержимое одного флакона **КПР** интенсивно взболтать. Если **КПР** содержит кристаллы, прогреть флакон при (35-37) С до их полного растворения. Развести **КПР** (26х) дистиллированной водой (см. таблицу), перемешать.

11.3 Подготовка раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата готовят перед использованием. Развести в чистом флаконе **КК** (11х) раствором **РРК** (см. таблицу). Тщательно перемешать, не допуская пенообразования.

12. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

12.1 Хранение тест-системы

Тест-систему хранят и транспортируют при температуре (2-8)°С. Не замораживать. Разрешается транспортирование при температуре (9-25)°С в течение десяти суток.

Срок годности тест-системы 14 месяцев.

12.2 Хранение реагентов после разведения

Рабочий промывочный раствор стабилен в течение 1 месяца при (2-8)°С или 36 часов при (18-25)°С при условии хранения в чистой, плотно закрытой емкости.

Рабочий раствор конъюгата стабилен в течение 20 часов при (2-8)°С или 8 часов при (18-25)°С при условии хранения в чистой, плотно закрытой емкости в защищенном от света месте.

12.3 Хранение реагентов после первичного вскрытия упаковки

После первичного вскрытия упаковки все реагенты стабильны в течение срока годности тест-системы при условии хранения в плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8)°С в защищенном от света месте.

В ходе проведения анализа допускается хранение реагентов тест-системы в течение 3 часов при температуре (18-25) С в защищенном от света месте.

13. РАСХОД РЕАГЕНТОВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Кол-во стрипов	Промывочный раствор		Раствор конъюгата		ТМБ-субстрат, мл	Стоп-реагент, мл
	КПР, мл	Дист.вода, мл	КК, мкл	РРК, мл		
1	6	150	100	1	1	1
2	12	300	200	2	2	2
3	18	450	300	3	3	3
4	24	600	400	4	4	4
5	30	750	500	5	5	5
6	36	900	600	6	6	6
7	42	1050	700	7	7	7
8	48	1200	800	8	8	8
9	54	1350	900	9	9	9
10	60	1500	1000	10	10	10
11	66	1650	1100	11	11	11
12	72	1800	1200	12	12	12

14. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

14.1 Процедура 1 с использованием термошейкера

Продолжительность анализа – 1 час 30 минут; объем исследуемого образца – 30 мкл

- Промыть планшет **1 раз промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **70 мкл РРС**.
- Внести в лунки по **30 мкл исследуемых образцов и контролей** (контроли обязательно включают в каждую постановку ИФА и вносят в первые лунки первого ряда в последнюю очередь):
 - если используются **1-2 стрипа**: **ПК - 1 лунка, ОК - 2 лунки**;
 - если используются **3 и более стрипов**: **ПК – 2 лунки, ОК – 3 лунки**.
 - в остальные лунки внесите исследуемые образцы.

При внесении образца сыворотки изменяется цвет раствора в лунке, что обеспечивает визуализацию внесения исследуемого образца в лунку

- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при **500 об/мин** при температуре **(37±2)°C** в течение **50 мин**.
- Промыть планшет **4 раза промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **100 мкл раствора конъюгата**.
- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при **500 об/мин** при температуре **(37±2)°C** в течение **20 мин**.
- Промыть планшет **6 раз промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **100 мкл ТМБ субстрата**.
- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при **500 об/мин** при температуре **(37±2)°C** в темном месте в течение **20 мин**.
- Внести в лунки по **100 мкл стоп-реагента** (в той же последовательности внесения, что и ТМБ субстрат).
- Не позже чем через **2-3 минуты** измерить ОП в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм). Визуальный учет результатов не допускается.

14.2 Процедура 2 без использования термошейкера

Продолжительность анализа – 2 часа; объем исследуемого образца – 30 мкл

- Промыть планшет **1 раз промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **70 мкл РРС**.
- Внести в лунки по **30 мкл исследуемых образцов и контролей** (контроли обязательно включают в каждую постановку ИФА и вносят в первые лунки первого ряда в последнюю очередь):
 - если используются **1-2 стрипа**: **ПК - 1 лунка, ОК - 2 лунки**;
 - если используются **3 и более стрипов**: **ПК – 2 лунки, ОК – 3 лунки**.
 - в остальные лунки внесите исследуемые образцы.

При внесении образца сыворотки изменяется цвет раствора в лунке, что обеспечивает визуализацию внесения исследуемого образца в лунку

- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при температуре **(37±2)°C** в течение **60 мин**.
- Промыть планшет **4 раза промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **100 мкл раствора конъюгата**.
- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при температуре **(37±2)°C** в течение **30 мин**.
- Промыть планшет **6 раз промывочным раствором** как указано в разделе «Требования к промывке».
- Внести в лунки по **100 мкл ТМБ субстрата**.
- Заклеить лунки клейкой пленкой и инкубировать при температуре **(18-25)°C** в темном месте в течение **30 мин**.

- Внести в лунки по **100 мкл стоп-реагента** (в той же последовательности внесения, что и ТМБ субстрат).
- Не позже чем через **2-3 минуты** измерить ОП в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм). Визуальный учет результатов не допускается.

14.3 Определение титра антител в положительных образцах (полуколичественное определение антител)

При необходимости можно определить титр IgG антител в 11 положительных сыворотках на 1 планшете.

- Внести в лунки A2-A12 по **180 мкл РРС**.
- Внести в лунки рядов с B2-B12 до H2-H12 включительно по **100 мкл РРС**.
- В лунки A2-A12 внести по **20 мкл исследуемых образцов** и тщательно перемешать пипетированием.
- Отобрать многоканальной пипеткой по **100 мкл** раствора из лунок A2-A12 и перенести в лунки B2-B12, перемешать пипетированием.
- Аналогично последовательно осуществить перенос разведений в другие ряды с 3^{го} по 8^й.
- Из лунок 8^{го} ряда (H2-H12) одноканальной пипеткой отобрать по **100 мкл** содержимого, перенести в маркированные пластиковые пробирки и сохранить до окончания анализа для возможного продолжения титрования в случае очень высокого содержания антител в образце.

В результате последовательных переносов содержимого в 11 вертикальных рядах получаем разведения исследуемых образцов 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 и 1:1280.

- В лунки первого ряда (A1-H1) вносят по **30 мкл контролей: ПК – 2 лунки, НК – 3 лунки**.
- Дальнейшее тестирование проводят, как описано для Процедуры 1 или 2.
- При учете результатов рассчитывают коэффициент позитивности для каждого из разведений исследуемого образца.

15. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитать среднее значение ОП **ОК** – ОК_{ср}.

Исключить значение **ОК** которое больше 0,1 или более чем в два раза превышает ОК_{ср}, и пересчитать ОК_{ср} по оставшимся значениям **ОК***.

- Проведение анализа считают достоверным, если ОК_{ср} не больше 0,1, а ОП **ПК** не меньше 0,6.

**Значения ОП ОК и исследуемых образцов меньше 0,00 (со знаком «-») при расчетах ГЗ и анализе результатов считать равными нулю*

- Рассчитать граничное значение (ГЗ), прибавляя константную величину к ОК_{ср}:

$$\text{ГЗ} = \text{ОК}_{\text{ср}} + 0,2$$

- Результат анализа считается **отрицательным**, если ОП исследуемого образца < ГЗ.
- Результат анализа считается **положительным**, если ОП исследуемого образца ≥ ГЗ.
- Результат анализа можно интерпретировать при помощи коэффициента позитивности (КП), который рассчитывают по формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ГЗ}}$$

- Результат анализа считается **отрицательным**, если КП < 1.
- Результат анализа считается **положительным**, если КП ≥ 1.
- Образцы, давшие положительный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках тест-системы:
 - образцы положительные в одной и более лунках следует считать положительными;
 - образцы отрицательные в двух и более лунках следует считать отрицательными.

Все образцы, которые при повторном анализе выявлены положительными, рекомендуется тестировать в тест-системе для выявления суммарных антител, например, DIA[®]-SARS-CoV-2, производства ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД».

• Количественное определение титра антител

Титром IgG антител к SARS-CoV-2 в образце считают максимальное разведение образца, при котором КП ≥ 1 .

Если КП образца в разведении 1:1280 больше 3,0, рекомендуется провести дальнейшее двукратное титрование сохраненного разведения образца 1:1280 (от 1:2560 и более).

16. КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

16.1 Точность

Повторяемость (repeatability) рассчитывали с использованием 8 положительных образцов, которые тестировали в 10 повторах 1 исполнитель с использованием одного комплекта оборудования:

Образец	Коэффициент вариации (CV, %)
14 Б-9	1,4
17 Б-9	1,5
19 Б-9	1,3
20 Б-9	0,7
22 Б-9	2,4
14 Б-4	2,3
67 Б-4	0,7
73 Б-4	0,8

Воспроизводимость (reproducibility) рассчитывали с использованием 3 положительных образцов, которые тестировали в 5 повторах 3 исполнителя в течение 3 дней с использованием разных комплектов оборудования.

Образец	CV, %
1	1,5
2	1,6
3	1,5
CV между днями	3,8

16.2 Кросс-реактивность и интерференция

Влияние кросс-реактивных и интерферирующих веществ на результат тестирования в DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG оценивали с использованием образцов, приведенных в таблице ниже. Возможна незначительная кросс-реактивность в отношении ВИЧ-1/2, HBsAg и патогенных коронавирусов человека 229E (IgG) и NL63 (IgG).

Наличие в исследуемых образцах маркеров других исследованных инфекций и интерферирующих веществ не должна влиять на результат тестирования в тест-системе DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG.

Категория	Количество образцов	Результат в DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG	
		Положительный	Отрицательный
ОРВИ	5	0	5
EBNA IgG	20	0	20
EBV IgG	16	0	16
CMV IgG	9	0	9
HCV	23	0	23
HIV-1/2	45	1	44
HBsAg	38	1	37
Беременные	15	0	15
Лечение соответствующими препаратами*	1	0	1
Ревматоидный фактор	6	0	6
HSV IgM	2	0	2
VZV IgG	2	0	2
VZV IgG+IgM	1	0	1
ANA	10	0	10
EBV IgM	7	0	7
MERS	1	0	1
Chlamydia pneumonia IgA	1	0	1
Вирус гриппа типы A+B IgG	1	0	1
Mycoplasma pneumonia IgM	1	0	1
Mycoplasma pneumonia IgA	1	0	1
Mycoplasma pneumonia IgA+IgM+IgG	1	0	1

Категория	Количество образцов	Результат в DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG	
		Положительный	Отрицательный
Образцы от вакцинированных против клещевого энцефалита	5	0	5
HCoV-HKU1 IgG	5	0	5
HCoV-HKU1 IgM	5	0	5
HCoV-NL63 IgG	5	1	4
HCoV-OC43 IgG	5	0	5
HCoV-229E IgG	5	2	3

* Амоксицилин 875 мг / клавуланатид 125 мг

16.3 Чувствительность и специфичность для стандартных панелей

Чувствительность и специфичность тест-системы DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG при тестировании стандартных панелей сывороток составляет 100%:

- При тестировании трёх стандартных внутрипроизводственных панелей сывороток ПП-26G ВПП-01/1, ПП-26G ВПП-02 и ПП-26G ВПП-03, содержащих и не содержащих IgG к вирусу SARS-CoV-2, все положительные сыворотки панели (всего 32 образца) в тест-системе DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG были выявлены положительными, а все отрицательные сыворотки панели (всего 10 образцов) были выявлены отрицательными.
- При проведении верификационных испытаний в ГУ «Центр общественного здоровья МЗ Украины» с использованием DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG и стандартной панели сывороток «СПК-SARS-CoV-2-IgG», содержащих и не содержащих специфических IgG антител к вирусу SARS-CoV-2, все положительные сыворотки панели (8 образцов) в тест-системе DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG были выявлены положительными, а все отрицательные сыворотки панели (10 образцов) были выявлены отрицательными.
- При проведении сравнительных испытаний тест-систем DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG и Architect SARS-CoV-2 IgG (Abbott, США), проведенных в Референс-лаборатории Научно-производственного центра трансфузиологии МЗ Республики Казахстан с использованием 92 образцов плазмы доноров-реконвалесцентов COVID-19, было продемонстрировано 100% выявление всех тестируемых образцов положительными в обеих тест-системах (100% совпадение результатов).
- При тестировании верификационной панели «Anti-SARSCoV-2 Verification Panel for Serology Assays», (NIBSC code: 20/B770, производства NIBSC, Великобритания), состоящей из 23 положительных на антитела к SARS-CoV-2 образца плазмы от реконвалесцентов и 14 SARS-CoV-2-отрицательных образцов, тест-система DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG выявила образцы как приведено в таблице ниже.

Результаты тестирования панели Anti-SARSCoV-2, NIBSC								
Количество образцов панели	Тест 1	Тест 2	Тест 3	Тест 4	Тест 5	Тест 6	Тест 7	DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG
Положительные 23	23(+)	23(+)	23(+)	21(+)/2(-)	23(+)	23(+)	23(+)	23(+)
Отрицательные 14	14(-)	14(-)	14(-)	14(-)	14(-)	14(-)	14(-)	14(-)

Тест 1 – Liaison SARS-CoV-2 S1/S2 IgG

Тест 2 – EUROIMMUN Anti-SARSCoV2 ELISA IgG

Тест 3 – Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG

Тест 4 – Siemens SARS-CoV-2 IgG

Тест 5 – DiaPro COVID-19 IgG

Тест 6 – EUROIMMUN AntiSARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG)

Тест 7 – Ortho COVID-19 IgG Antibody

Тест-система DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG демонстрирует результаты сопоставимые с результатами тест-систем ведущих производителей.

16.4 Клинические исследования

Чувствительность

При тестировании образцов от 35 человек с подтвержденным в ПЦР диагнозом COVID-19 с длительностью симптомов COVID-19 более 18 дней, полученных из больниц и лабораторий Украины и Германии, чувствительность тест-системы DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG (процент совпадения положительных результатов с ПЦР) составляет 100%.

Специфичность

При тестировании 186 образцов сывороток от здоровых доноров, полученных до пандемии COVID-19 (до ноября 2019) диагностическая (клиническая) специфичность тест-системы DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG составляет 98,4%.

17. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

В случае ранней инфекции в период сероконверсионного окна, когда антитела отсутствуют или их уровень очень низкий и находится за пределами чувствительности данной тест-системы, результат серологического исследования может быть отрицательным. В этом случае при наличии клинических симптомов заболевания рекомендуется провести повторное обследование пациента в данной тест-системе через несколько дней. Для установления окончательного диагноза необходимо учитывать не только результаты серологического теста, но также данные тестирования в ПЦР, наличие клинических симптомов заболевания и рентгенологические данные обследования легких. Не тестировать пулированные образцы. Производитель не может гарантировать достоверность результатов тестирования таких образцов, так как подобных исследований не проводилось.

К ложноотрицательным и ложноположительным результатам может привести несоблюдение правил подготовки и хранения образцов и грубые нарушения процедуры анализа, установленной производителем.

18. ЛИТЕРАТУРА

1. Juanjuan Zhao, Quan Yuan, Haiyan Wang, Wei Liu, Xuejiao Liao et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. Clinical Infectious Diseases, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>. Published: 28 March 2020
2. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for 2 detecting antibodies against SARS-CoV-2. JCM Accepted Manuscript Posted Online 30 March 2020, J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.00461-20
3. Nisreen M.A. Okba, Marcel A. Müller, Wentao Li, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. Emerging Infectious Diseases, Volume 26, Number 7-July 2020, doi: 10.3201/eid2607.200841
4. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. Journal of medical virology. First published: 07 February 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25702>

КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА

Процедура с термошейкером – 1

Процедура без термошейкера – 2

Промывка 1 раз		
↓		
Инкубация с образцами	1) 50 мин, 500 об/мин, (37±2)°C или 2) 60 мин, (37±2)°C	350-400 мкл промывочного раствора 70 мкл РРС + 30 мкл образца
↓		
Промывка 4 раза		350-400 мкл промывочного раствора
↓		
Инкубация с конъюгатом	1) 20 мин, 500 об/мин, (37±2)°C или 2) 30 мин, (37±2)°C	100 мкл раствора конъюгата
↓		
Промывка 6 раз		350-400 мкл промывочного раствора
↓		
Инкубация с ТМБ субстратом	1) 20 мин, 500 об/мин, (37±2)°C в темноте или 2) 30 мин, (18-25)°C в темноте	100 мкл ТМБ субстрата
↓		
Остановка реакции		100 мкл стоп-реагента
↓		
Учет результатов	2-3 мин	450/620 нм



ЧАО «НПК «ДИАПРОФ-МЕД»

04123, Украина, г. Киев, Светлицкого, 35.

Тел.: +38(044) 463-0603, +38(044) 434-9128,

+38(067) 343-5993, Факс: +38(044) 463-0602

E-mail: tech@diapr.kiev.ua www.diaproph.com

Уполномоченный представитель ООО «БелФармАйс»

производителя на принятие

претензий на территории

Республики Беларусь

220035, г. Минск, ул. Тимирязева, д.65А, пом.300, каб.3

Тел./факс: +375 29 670 45 80, belfarmice@gmail.com

В случае нарушения предусмотренных производителем условий хранения, транспортировки и процедуры постановки ИФА, претензии рассматриваются как необоснованные.

ПОЯСНЕНИЯ К СИМВОЛАМ



Производитель



Дата изготовления (формат ГГГГ-ММ)



Использовать до (формат ГГГГ-ММ, срок годности до конца указанного месяца)



Количество исследований



Медицинское изделие для диагностики IN VITRO



Температурное ограничение



Номер серии



Каталожный номер



Ознакомление с инструкциями по использованию



Национальный знак соответствия Украины

Редакция №1 от 2021-03 г.