

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ IgM ДО COVID-19

COVID-19 IgM

Кат. №: **COV19M.CE**

Дата випуску інструкції: **03-02-2021**

Версія: **6**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпасти.

ІФА для визначення антитіл IgM до COVID-19 у сироватці та плазмі крові людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Ферментний імуноаналіз (ІФА) для визначення антитіл IgM до COVID-19 у плазмі та сироватці людини.

Набір призначений для моніторингу імунної відповіді на COVID-19 на ранній стадії інфекції як додатковий маркер до ПЛР.

Тільки для діагностики «in vitro».

В. ВСТУП

Хвороба коронавірусу 2019 (COVID-19) спричинена важким гострим респіраторним синдромом коронавірусу 2 (SARS-CoV-2), який вперше був виявлений на тлі спалаху захворювань на респіраторні захворювання в місті Ухань, провінція Хубей, Китай, і з тих пір спричинив глобальну пандемію. SARS-CoV-2 є одноланцюговим РНК-вірусом у позитивному сенсі і належить до роду Бетакоронавірусів, який також включає SARS CoV (2003) та MERS CoV (2012). Як і всі інші коронавіруси, геном SARS-CoV-2 (2019-nCoV) кодує спайковий білок, білок оболонки, мембранний білок та нуклеокапсидний білок. У тих, хто інфікований COVID-19, симптоми можуть бути незначними або відсутніми. Симптоми COVID-19 схожі на застуду або грип і можуть проявлятися до 14 днів після контакту з SARS-CoV-2. Серед симптомів: лихоманка, кашель, утруднене дихання, пневмонія в обох легенях.

У важких випадках інфекція може призвести до смерті. Сучасні тести на SARS-CoV-2 беруть генетичний матеріал вірусу в мазках з ротової порожнини, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). ПЛР дає позитивний результат лише тоді, коли вірус все ще присутній. Тести не можуть ідентифікувати людей, які перенесли інфекцію, одужали та очистились від вірусу.

Імуноферментні аналізи (ІФА) є більш швидкими серологічними тестами, які забезпечують зчитування взаємодій антиген-антитіло.

По суті, антитіла пацієнта «затиснуті» між вірусним білком, що нас цікавить, та антитілами-репортерами, так що виявляються будь-які активні антитіла пацієнта.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті імунодомінантними рекомбінантними спайк-глікопротеїнами та нуклеокапсидними антигенами, специфічними для COVID-19.

Розподіл зразків та компонентів контролюється Системою Моніторингу Додавання Зразків DiaPro («SAMS»), де за правильним додаванням зразків та реагентів аналізу здійснюється візуальний нагляд з поетапною зміною кольорів.

Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком у присутності реагенту, що блокує RF; IgM захоплюються, якщо вони є, антигенами. Після вимивання всіх інших компонентів зразка в 2-й інкубації зв'язані антитіла виявляються додаванням поліклональних специфічних антитіл до IgM людини, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості анти-COVID-19 IgM, присутній у зразку. Порогове значення cut-off дозволяє оптичну щільність інтерпретувати як негативні та позитивні результати IgM COVID-19.

Нейтралізація IgG анти-COVID та RF, що проводиться безпосередньо в лунці, проводиться в аналізі, щоб заблокувати подібні види інтерференцій.

D. КОМПОНЕНТИ

Код COV19M.CE містить реагенти для 96 тестів.

Мікропланшет MICROPLATE

1 мікропланшет. 12 смужок по 8 мікролунок, покритих рекомбінантними нуклеокапсидними та спайк-антигенами. Пластини запечатані в пакет з осушувачем.

Негативний контроль CONTROL -

1x2.0 мл/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить 1% білків козячої сироватки, 10 мМ Na-цитратний буфер pH 6.0 +/- 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Негативний контроль **кодується жовтим кольором**.

Позитивний контроль CONTROL +

1x2 мл/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить 1% білків козячої сироватки, IgM людини, позитивний до COVID-19, 10 мМ Na-цитратний буфер pH 6.0 +/- 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Позитивний контроль **кодується зеленим кольором**.

Ферментний кон'югат CONJ

1x16 мл/флакон. Готовий до використання реагент, **кодований рожевим/червоним кольором**. Він містить в якості консервантів кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла кози до IgM людини, 5% BSA, 10 мМ трис-буфер pH 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 та 0.02% гентаміцину сульфату.

Хромоген/Субстрат SUBS TMB

1x16 мл/флакон. Готовий до використання компонент. Він містить 50 мМ цитратно-фосфатного буфера, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетра-метил-бензидину або TMB і 0.02% перекису водню або H₂O₂.

Примітка: Зберігати захищеним від світла, чутливий до сильного освітлення.

Розчинник для зразка DILSPE

2x50 мл/пляшка. Він містить 1% білків козячої сироватки, 10 мМ Na-цитратний буфер pH 6.0 +/- 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Для розведення зразка.

Примітка: Розчинник змінює колір від оливково-зеленого до темно-синювато-зеленого у присутності зразка.

Нейтралізуючий реагент SOLN NEUT

1x8.0 мл/флакон. Готовий до використання реагент. Він містить козячий анти-людський IgG, 10 мМ забуферений трис розчин, pH 8.0 +/- 0.1, що містить 0.045% ProClin 300. Для блокування інтерференцій через RF.

Примітка: Рідина змінює колір від світло-жовтого до темно-зеленувато-синього при додаванні розведеного зразка.

Концентрат Промивного буфера WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка. 20x концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.045% ProClin 300.

Сірчана кислота H₂SO₄ 0.3 M

1x15 мл/пляшка. Містить 0.3 M розчину H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

Вкладиш інструкції x 1 шт.

Важлива примітка:

Тільки за конкретним запитом, Dia.Pro може поставити реагенти для 192 тестів, як повідомляється нижче:

1. Мікропланшет	x 2
2. Негативний контроль	1x4.0 мл/флакон
3. Позитивний контроль	1x4.0 мл/флакон
4. Ферментний кон'югат	2x16 мл/флакон
5. Хромоген/Субстрат	2x16 мл/флакон
6. Розчинник для зразків	3x60 мл/флакон
7. Нейтралізуючий реагент	1x15 мл/флакон
8. Концентрат Промивного буфера	2x60 мл/пляшка
9. Сірчана кислота	1x32 мл/пляшка
10. Ущільнювальна фольга для планшета	x 4
11. Вкладиш інструкції	x 1
Кількість тестів	192
Код	COV19M.CE.192

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (200 мкл і 10 мкл) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +37 °С.
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (зчитування) та з 620-630 нм (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові та компонентів крові, він повинен використовуватися в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерство охорони здоров'я або аналогічний орган) для проведення такого типу аналізу.
3. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
4. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
5. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген/Субстрат дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
6. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °С у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
7. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
8. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
9. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
11. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
12. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
13. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
14. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18

годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °С протягом 20 хв.

15. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
16. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
17. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату, даючи помилково негативні результати.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
4. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 °... + 8 °С у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °С принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту. Див. також Розділ S (Обмеження).
6. Якщо після розморожування присутні частинки (як це часто трапляється зі старими зразками в невеликих об'ємах і в плазмі), центрифугуйте при 2000 об./хв. протягом 20 хв. або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8μ для очищення зразка перед тестуванням.
7. Оскільки Розчинник для зразків (DILSPE) містить сильну інактивуючу віруси речовину, розбавлені зразки можуть належним чином зберігатися при + 2.8 °С лише протягом 48 годин.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 використань пристрою та терміном до 6 місяців.

Мікропланшети:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшеті досягти кімнатної температури (близько 1 години).

Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro.

Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2 °...8 °С. При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не перетвориться з жовтого на зелений.

Негативний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Позитивний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити водою класу EIA до 1200 мл і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Оскільки деякі кристали солі можуть бути присутніми у флаконі, подбайте про те, щоб розчинити весь вміст, готуючи розчин.

Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2..8 °C.

Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові, можливо стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не надавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Нейтралізуючий реагент:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

Сірчана кислота:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подрознююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази**:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази**:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

- Мікропіпетки** повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
- Інкубатор ІФА** слід встановити на +37 °C (допуск +/- 0.5 °C) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
- Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на

технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід праймувати розведеним Промивним Розчином.

Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M NaOH).

5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками.

Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.

4. Час інкубації має допуск ± 5%.

5. **Зчитувач мікропланшетів ІФА** повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм та другим фільтром 620-630 нм, обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 нм; (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.

6. Використовувати **автоматизовані робочі станції ІФА** рекомендується при скринінгу досить великої кількості зразків (> 50 зразків).

При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання.

Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок.

При використанні автоматичних пристроїв, якщо тримач пробірки приладу не підходить до пробірок, що входять до набору, перелийте розчин у відповідні контейнери та позначте їх тим самим ярликом, відклеєним від оригінального флакона. Ця операція важлива, щоб уникнути невідповідності вмісту флаконів при їх передачі. Після закінчення тесту поверніть контейнери із вторинним маркуванням до температури 2..8 °C, щільно закупоривши.

Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім перемішайте, як описано.
- Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
- Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.

- Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

М. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

АВТОМАТИЗОВАНИЙ АНАЛІЗ:

Якщо тест проводиться автоматично за допомогою системи ІФА, дотримуйтесь інструкцій нижче, щоб запрограмувати протокол аналізу.

- Розведіть зразки 1:41 у відповідній пробірці відповідно до інструкції з використання приладу. (Як приклад: 10 мкл зразка + 400 мкл DILSPE). Змішати шляхом аспірації та внесення.
- Лунка А1 використовується для бланкування.
- Внесіть 50 мкл Нейтралізуючого реагенту (SOL NEUT) у всі лунки мікропланшета, крім А1 для бланкування.

Важливе зауваження: Нейтралізуючий реагент здатний блокувати хибнопозитивні реакції через RF. Позитивні зразки на внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були визначені позитивними за допомогою IVD, що не проводить жодної реакції блокування RF.

- Внесіть 200 мкл Негативного контролю у трьох примірниках та 200 мкл Позитивного контролю в одному примірнику у відповідні контрольні лунки (наприклад: B1+C1+D1 для негативного контролю та E1 для позитивного контролю). Не розбавляйте контролю, оскільки вони попередньо розведені, готові до використання!
- Внесіть 200 мкл попередньо розведених зразків у відповідні лунки для зразків.
- Для наступних операцій дотримуйтесь інструкцій з експлуатації, наведених нижче для ручного аналізу.

Важливе зауваження: Візуально стежте за тим, щоб зразки потрапляли у відповідні лунки. Цього просто досягають, перевіряючи, чи забарвлюється лунка в інтенсивний синій колір.

Настійно рекомендується перевірити, що проміжок часу між внесенням першого та останнього зразків буде розрахований приладом та врахований шляхом відповідної затримки першої операції промивання.

РУЧНИЙ АНАЛІЗ:

- У відповідні пробірки дозуйте 400 мкл Розчинника для зразків (DILSPE); потім додайте 10 мкл зразка, щоб отримати остаточне розведення 1:41. Змішайте зразок на вортексі. Переконайтеся, що колір переходить із світло-зеленого в синювато-зелений.
- Помістіть необхідну кількість лунок у тримач мікролунок. Залиште 1-у лунку порожньою для операції бланкування.
- Додайте 50 мкл Нейтралізуючого реагенту (SOL NEUT) у кожну лунку пластини, крім А1.
- Розподіліть 200 мкл Негативного контролю у трьох примірниках та 200 мкл Позитивного контролю в одному примірнику у правильно визначені контрольні лунки. Не розбавляйте Контролі, оскільки вони попередньо розведені, готові до використання!
- Нарешті внесіть 200 мкл розведених зразків у всі лунки для зразків.

Важлива примітка: Перевірте, чи колір лунки після додавання зразка змінюється з синювато-зеленого до темно-синього.

- Акуратно перемішайте пластину вручну, уникаючи переповнення та забруднення сусідніх лунок.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при + 37 °С**.

Важливе зауваження: Смужки слід герметизувати клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, подавши та аспіруючи 350 мкл/лунку розведеного промивного розчину, як зазначено у розділі І.3.

- Піпетуйте 100 мл Ферментного Кон'югату у кожну лунку, крім першої лунки для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей рожевий/червоний компонент розподілений у всі лунки, крім А1.

Важливі примітки: Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунки наконечником піпетки, коли дозується кон'югат. Може статися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при + 37 °С**.
- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 8.
- Піпетуйте 100 мкл суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунку. Потім інкубуйте мікропланшет протягом **15 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °С)**.

Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може створюватися високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 10, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю та позитивних зразків з блакитного на жовтий/коричневий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (зчитування) та при 620-630 нм (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці А1 (обов'язково).

Важливі зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми видачі:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S4											
B	NC	S5											
C	NC	S6											
D	NC	S7											
E	PC	S8											
F	S1	S9											
G	S2	S10											
H	S3	S11											

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний Контроль PC = Позитивний Контроль S = Зразок

У таблиці нижче об'єми та процедури наведені для ручного методу.

Метод	Операції
Зразки + DILSPE	10 мкл + 400 мкл (розведення 1:41)
Нейтралізуючий реагент	50 мкл
Контролі	200 мкл
Розведені зразки	200 мкл
1-я інкубація	45 хв.
Температура	+37 °С
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл
2-я інкубація	45 хв.
Температура	+37 °С
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
TMB/H ₂ O ₂	100 мкл
3-я інкубація	15 хв.
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл
Зчитування ОЦ	450 нм/620-630 нм

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Будь-коли, коли використовується набір, виконується контроль, щоб перевірити, чи відповідають очікуваним значенням OD 450 нм/620 нм, як зазначено у таблиці нижче.

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення OD 450 нм
Негативний контроль (NC)	< 0.150 Середнього значення OD 450 нм після бланкування
Позитивний контроль	S/Co > 1.1

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, оскільки дані недійсні.

Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань обчислюють за допомогою граничного значення cut-off, визначеного за такою формулою для середнього значення OD 450 нм/620-630 нм для Негативного Контролю (NC).

$$NC + 0.250 = \text{Cut-off (Co)}$$

Значення, знайдене для тесту, використовується для інтерпретації результатів, як описано в наступному параграфі.

Важливе зауваження: Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для обчислення граничної величини cut-off та отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD450 нм зразка та значення cut-off (або S/Co), згідно з наступною таблицею.

Під час подальшого спостереження за COVID-19 при підозрі на інфекції застосовується таке тлумачення:

S/Co	Інтерпретація
< 0.9	Негативний
0.9 – 1.1	Сіра зона
> 1.1	Позитивний

Негативний результат вказує на те, що у суб'єкта не розвинулися ІgM до COVID-19.

Будь-якого суб'єкта, що має **двозначний** (Сіра зона) результат, слід повторно перевірити на другому зразку, відібраному через 1-2 тижні у пацієнта, та обстежити.

Позитивний результат свідчить про наявність антитіл ІgM до COVID-19.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.**
- Будь-який позитивний результат повинен бути підтверджений альтернативним методом, здатним виявляти антитіла ІgM (приклад - тест підтвердження/типуння Dia.Pro) перед постановкою діагнозу. **Наявність ІgM не можна використовувати самостійно для постановки діагнозу інфекції COVID-19.**
- У виняткових випадках набір використовується для скринінгу **медичних працівників** із ризиком зараження COVID-19 або для оцінки **набутого імунного статусу осіб із нормальної популяції**, застосовується таке тлумачення:

S/Co	Інтерпретація
< 0.9	Негативний
0.9 – 1.1	Сіра зона
1.1 – 2.0	Низько позитивний
> 2.0	Позитивний

а також для інтерпретації даних використовується «Індекс довіри» (або ступінь надійності):

- для значень $1.1 < S/Co < 2$ позитивність має низький показник достовірності. Якщо, проте, антитіла ІgG, при тестуванні в поєднанні з ІgM, виявляють позитивний або двозначний

результат, пропонуються подальші діагностичні дослідження на зразку, відібраному через 7-10 днів від першого.

- для $S/Co > 2$, навпаки, індекс довіри високий, і в цьому випадку пропонується подати зразок на Підтверджувальний аналіз DiaPro, як уже повідомлялося. Якщо антитіла ІgG при комбінованому тестуванні також є позитивними, людину слід перевірити на РНК COVID-19 та/або подати на комп'ютерну томографію (CAT).

- Коли результати тесту передаються з лабораторії до інформаційного центру, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

Р. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Всі показники все ще перебувають на стадії оцінки, враховуючи складність оцінки, зокрема, зразків, отриманих від інфікованих госпіталізованих пацієнтів.

Діагностична специфічність:

Аналіз тестували на сотнях зразків, відібраних до спалаху COVID-19, наданих Національним центром крові.

Виявлене значення становить $\geq 98\%$.

Потенційні перехресні реакції з іншими респіраторними інфекційними агентами вивчали на зразках, позитивних на антитіла до: PIV1-3, грипу А та В, Н. Influenzae, hCoV 229E, hCoV OC43, hCoV HKU1, hCoV NL63, Риновірусу, RSV, Аденовірусу, М. Pneumoniae і С. Pneumoniae.

Перехресних реакцій не спостерігалося.

Також були перевірені антитіла, зазвичай присутні в сироватках та плазмі людини, до неспоріднених інфекційних агентів. Антитіла, позитивні до CMV, EBV, HSV1 & 2, токсоплазми, краснухи, Н. Рylogi, малярії sps, вірусу Коксаки, Парвовірусу В19 та HCV, ВІЛ, сифілісу та HBsAg, не реагували перехресно.

Дані зведені в наступних таблицях:

Інші респіраторні інфекційні мікроби та віруси (зразки до пандемії)

Категорія	Стать	Вік	COVID-19 ІgM		
			Кількість тестових зразків	Поз.	Нег.
PIV 1-3 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	11	0	11
Influenza A+B (вакциновано 10/2019)	Чоловік&Жінка	25-40	12	0	12
Anti H. influenza Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
hCoV 229E Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	2	0	2
hCoV OC43 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	8	0	8
hCoV HKU1 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3
hCoV NL63 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	1	0	1
hCoV HKU1/NL63 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
SARS-CoV 1 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	1	0	1
Rinovirus Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	1	0	1
RSV Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	9	0	9
Adenovirus Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	10	0	10
M.pneumoniae Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	10	0	10
C.pneumoniae Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3

Не пов'язані мікроби

Категорія	Стать	Вік	COVID-19 ІgM		
			Кількість тестових зразків	Поз.	Нег.
CMV ІgM+	Чоловік&Жінка	25-40	4	0	4
CMV ІgG+	Чоловік&Жінка	25-40	4	0	4
EBV EBNA ІgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
EBV VCA ІgM+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
HSV1 & 2 ІgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Toxo ІgG+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3
Rub ІgG+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3
H.Pylori ІgG+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3
HCV Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3
HIV Ab&Ag +	Чоловік&Жінка	25-40	4	0	4
HBsAg+	Чоловік&Жінка	25-40	2	0	2
HBsAb+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Syphilis Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	1	0	1
Malaria Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	3	0	3
Coxsackie virus Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Parvovirus B19 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	2	0	2

Поширені аутоантитіла (переважно щитовидна залоза, печінка, ANA та ENA) при аутоімунних захворюваннях не давали хибнопозитивних результатів.

Ніяких інтерференцій у вагітних жінок, порушення рівня печінкових ферментів та інших загальних специфічних для органів патологій не спостерігалося.

Минулі інфекції SARS-CoV-1 можуть спричинити інтерференцію та відповідь IgM через високий рівень генетичної гомології між двома вірусами. Інший штам коронавірусу спричиняє легку відповідь IgM з огляду на подібність різних штамів.

Були вивчені добре відомі потенційно інтерферуючі зразки в ІФА. Результати представлені в таблиці нижче:

Речовини	Концентрації	Оцінка
Гемоглобін	До 500 мг/дл	негативний
Білірубін	До 20 мг/дл	негативний
Тригліцериди (каламутні зразки)	До 3000 мг/дл	негативний
Сироваткові білки	До 15 г/дл	негативний
RF +	До 2500 Од/мл (Cobas)	негативний
Anti E-Coli Ab +	Дуже позитивний	негативний

Не було виявлено помилкової реактивності через методу аналізу.

Ті самі потенційні інтерферуючі зразки були насичені зразком, високо позитивним на IgM до нуклеокапсидного ядра COVID-19. Не було виявлено помилково негативних результатів, що підтверджує відсутність інтерференції таких речовин в тестуванні позитивних зразків.

Для визначення значення специфічності використовували як плазму, отриману з різними стандартними методиками приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки. Заморожені зразки також тестували на предмет інтерференції через збір та зберігання. Ніяких інтерференцій не спостерігалося за умови, що зразок був прозорим та не мстив частинок/скупчень.

Інтерференції були помічені, коли в зразку були присутні агрегати фібрину, видимі частинки та ліпідні шари, що зазвичай давало хибнопозитивний результат. Ці зразки перед тестуванням слід очистити фільтруванням на фільтрі 0.22 мкм (ліпідні шари) або центрифугувати протягом 30 хв. при 4000 об/хв. (агрегати) або викинути як непридатні для тестування.

Діагностична чутливість:

Багатоцентрове міжнародне дослідження (кілька лікарень COVID-19 в Італії, Великобританії, Франції, Іспанії, Еквадорі) було проведено в контексті надзвичайної ситуації з охороною здоров'я.

Зразки з когорті інфікованих пацієнтів, деякі з яких після одужання, показали чутливість краще ніж 98%.

Спостерігалася хороша кореляція позитивності IgM у пацієнтів з ПЛР+, протестованих на початку появи симптомів.

У деяких випадках IgM виявляли пізніше, ніж IgG, як повідомляється у спеціальній літературі щодо сероконверсії COVID-19.

Така кореляція досягла майже 100% відносно результатів ПЛР+ під час спостереження за пацієнтом. Деякі випадки присутні у дослідженні ПЛР-пацієнтів із симптомами інфекції, які виявили специфічну сероконверсію COVID-19.

Все дослідження доступне за запитом; його результати коротко зведені нижче.

У внутрішніх дослідженнях усі зразки, які були виявлені позитивними на IgM, підтвердили позитивним результатом у Підтверджуючому аналізі DiaPro на IgM до Нуклеокапсиду. У деяких випадках IgM також були позитивними до слайк-антигенів, але жоден не був позитивним лише до них, підтверджуючи, що сероконверсія до антитіл починається спочатку до Нуклеокапсиду.

Коли пацієнти з COVID-19 IgM тестували пізніше в процесі зараження та після повного одужання, антитіла IgM виявляли тенденцію залишатися позитивними навіть протягом декількох тижнів після одужання, але з тенденцією до зниження їх S/Co; IgG, навпаки, мають тенденцію до збільшення таких значень.

Нещодавно NIBSC/BOO3 випустила панель - панель верифікації анти-SARS-CoV-2 для серологічних аналізів код 20/B770 - спрямовану на надання даних про ефективність такої IVD.

Результати представлені в таблиці нижче з посиланням на дані, представлені NIBSC у своєму паспорті для IgG до NCP+SPIKE (код COV19G.CE):

Зразок	Dia.Pro COV19M.CE	DIA IgG	Зразок	Dia.Pro COV19M.CE	DIA IgG
№	S/Co	S/Co	№	S/Co	S/Co
1	2.2	8.1	20	4.6	8.9
2	3.0	10.5	21	10.0	10.7
3	11.5	11.1	22	11.1	9.4
4	6.1	9.4	23	6.5	10.2
5	8.5	11.3	24	0.1	0.1
6	2.5	7.0	25	0.1	0.2
7	2.3	4.2	26	0.1	0.5
8	8.5	11.2	27	0.1	0.3
9	11.1	11.3	28	0.1	0.1
10	11.7	11.1	29	0.1	0.3
11	0.9	3.9	30	0.1	0.2
12	5.8	7.3	31	0.2	0.4
13	7.0	9.6	32	0.1	0.4
14	3.7	8.3	33	0.1	0.2
15	5.7	10.1	34	0.1	0.9
16	2.0	8.0	35	0.1	0.2
17	6.5	9.6	36	0.2	0.5
18	12.0	11.1	37	0.1	0.2
19	8.8	10.1			

Точність:

Повторюваність (**в аналізі**) вивчали на 3 зразках, одному негативному, одному низькопозитивному та одному високопозитивному, досліджених у 16 повторях. Результати показали значення CV у діапазоні 4-20% залежно від їх OD450 нм.

Відтворюваність (**між аналізами**) вивчали на тих самих 3 зразках, випробуваних у 16 повторях протягом 3 разів.

Виявлена варіабельність, що становила 4-20% залежно від OD450 нм зразка, не призвела до неправильної класифікації зразка.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Як повідомляється у відповідному розділі, високоліпемічні («молочні») та гемолізовані («червоні») зразки можуть генерувати помилково позитивні реакції.

Дуже високі титри Ревматоїдного Фактора понад 2500 Од/мл можуть призвести до хибнопозитивного результату.

При тестуванні заморожених зразків, зокрема тих, які:

- були піддані декільком циклам заморожування та відтавання;
- вже були «брудними» за походженням під час аліквотування;
- були аліквотовані в невеликому об'ємі через тенденцію до перетворення на желе через випаровування;
- складаються з плазми через їхню тенденцію до утворення агрегатів фібрину при розморожуванні;
- зразки IgM, які за своєю природою мають тенденцію до агрегування при заморожуванні та відтаванні та стають «липкими», деякі помилково позитивні реакції, цілком ймовірно, можуть бути отримані.

ЛІТЕРАТУРА

- Wu, A. et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. Cell Host Microbe <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001> (2020).
- Lu, R. et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet 395, 565–574 (2020).
- Zhou, P. et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
- Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N. Engl. J. Med. 382, 727–733 (2020).
- Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 395, 497–506 (2020).
- Li, Q. et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. N. Engl. J. Med. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316> (2020).
- Liu, Y., Gayle, A. A., Wilder-Smith, A. & Rocklöv, J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. J. Travel Med. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021> (2020).
- Tang, B. et al. Estimation of the transmission risk of the 2019-nCoV and its implication for public health interventions. J. Clin. Med. 9, 462 (2020).

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

*Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*

ТОВ ДІА.ПРО

*Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

*ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua*

