

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ IgG ДО COVID-19 (ПІДТВЕРДЖЕННЯ)

COVID-19 IgG Confirmation

Кат. №: **COV19CONF.CE**

Дата випуску інструкції: **06-2020**

Версія: **2**



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

Імуноферментний аналіз у вигляді смужки-модуля для підтвердження IgG антитіл до COVID-19 основних антигенів в сироватці і плазми людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Модульний імуноферментний аналіз (ІФА) для підтвердження зразків, позитивних на антитіла IgG до COVID-19 під час першого скринінгу. Тест може бути використаний на додаток до виявлення специфічності антитіл до основних імунодомінантних антигенів COVID-19.

Тільки для діагностики «in vitro».

B. 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 майже 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.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Модуль, на якому базується продукт, складається з наступних смужок мікропланшетів:

		Модуль			
		Смужки			
Зразки	A	Негативний контроль	Spike глікопротеїн 1	Spike глікопротеїн 2	Нуклеокапсидний
	B				
	C				
	D				
	E				
	F				
	G				
	H				
Код Ag	N	S1	S2	C	

Де смужки:

N = Негативний внутрішній контроль (смужка з покриттям BSA)

S1 = Покритий рекомбінантним Spike глікопротеїном 1

S2 = Покритий рекомбінантним Spike глікопротеїном 2

C = Покрита рекомбінантним Нуклеокапсидом «Core»

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.

Вносяться розведені зразки (A, B, C та ін.), горизонтально вздовж смужок модуля у всі лунки від 1 до 4 (напр.: A1 + A2 + A3 + A4 для зразка A).

Після вимивання всіх інших компонентів зразка в 2-й інкубації зв'язані антитіла виявляються додаванням антитіл анти-IgG людини, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл IgG, присутніх у зразку. Наявність IgG у зразку може бути визначена напівкількісно за допомогою граничного значення cut-off, здатного розрізняти негативні та позитивні зразки.

D. КОМПОНЕНТИ

Набір містить реагенти для 24 тестів.

Один повний модуль повинен бути використаний для тестування 8 зразків загалом за 3 прогони.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок x 8 мікролунок, покритих рекомбінантними COVID-19 специфічними антигенами. Пластини запечатані в пакет з осушувачем.

2. Негативний контроль CONTROL -

1x2.0 мл/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить 1% білків козячої сироватки, 10 mM 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**.

Важливе зауваження: Контроль надається на випадок, якщо лабораторія хоче провести Контроль Якості набору.

3. Позитивний контроль CONTROL +

1x1.2 мл/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить 1% білків козячої сироватки, IgA людини, позитивний до COVID-19, 10 mM 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**.

4. Концентрат Промивного буфера WASHBUF 20X

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

5. Ферментний кон'югат CONJ

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

6. Хромоген/Субстрат SUBS TMB

1x16 мл/флакон. Готовий до використання компонент. Він містить 50 mM 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.

7. 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).

8. Розчинник для аналізу DILAS

1x 8 мл/флакон. Забуферений 10 mM Трис розчин, pH 8.0 +/- 0.1, що містить 0.045% ProClin 300, для попередньої обробки зразків та контролів на планшеті, блокуючи інтерференцію.

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

9. Розчинник для зразка DILSPE

1х50 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-синувато-зеленого у присутності зразка.

10. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

11. Вкладиш інструкції x 1 шт.

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 вугіллям, 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. 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.
3. Розглядайте всі **зразки** як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися з Рівнем 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю захворювань, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
4. 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 надавайте Хромоген/Субстрат дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °С у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не міняли місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
11. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
12. **Відходи**, що утворились 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. З іншими відходами, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід поводитися як з потенційно інфекційними та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

13. 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.

14. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.

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 5 (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 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 терміном до 6 місяців при зберіганні за температури 2-8 °С.

Мікропланшети:

Готовий до використання. Коли потрібно використовувати лише смужки-модуль, вийміть мікропланшет з пакета, вийміть інші смужки і покладіть назад у пакет, щільно його закрити. Модуль можна використовувати для тестування 8 зразків одночасно.

Негативний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Позитивний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

Розчинник для аналізу:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

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 піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

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

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити водою класу ЕІА 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 °С.

Сірчана кислота:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча 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

- 1. 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.
- 2. Інкубатор ІФА** слід встановити на +37 °С (допуск +/- 0.5 °С) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
- 3. 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 помилок 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.** 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

- 1.** Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- 2.** 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.
- 3.** Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- 4.** Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім перемішайте, як описано.
- 5.** Встановіть інкубатор ІФА на +37 °С і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
- 6.** Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
- 7.** Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- 8.** Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- 9.** У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

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

Важливе зауваження: Контролі використовуються лише у тому випадку, якщо лабораторія хоче провести аналіз Контролю Якості набору. У цьому разі, не розбавляйте контролі, оскільки вони готові до використання.

У такому випадку дозуйте контролів по 200 мкл у відповідні контрольні лунки, дотримуючись тієї самої схеми дозування, наведеної на сторінці 6 (в оригіналі англ. мовою) для зразків.

- 1.** Розбавте зразок 1:20 у прозорій пробірці для розведення, додавши 50 мкл зразка до 1 мл Розчинника для зразка (DILSPE). Змішайте на вортексі. Після додавання зразка колір всього розчину змінюється із світло-зеленого у темно-синювато-зелений.
- 2.** Додайте 50 мкл Розчинника для аналізу (DILAS) у лунки для зразків.
- 3.** Внесіть горизонтально по 200 мкл розведеного зразка в кожну лунку модуля (наприклад: зразок 1 в A1 + A2 + A3 + A4). Перевірте, чи колір зразків змінюється на темно-синій.

Акуратно перемішайте пластину вручну, уникаючи будь-яких розливів.

4. Інкубуйте мікропланшет протягом 45 хвилин при + 37 °С.

Важливе зауваження: Смужки слід герметизувати клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається, лише тоді, коли тест проводиться вручну.

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

6. Піпетуйте 100 мкл Ферментного Кон'югату у кожен лунку і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей рожевий/червоний компонент розподілений у всі лунки.

Важливі примітки: Будьте обережні, щоб не торкнутися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, заповненим Ферментним Кон'югатом. Може статися забруднення.

7. Інкубуйте мікропланшет протягом 45 хвилин при + 37 °С.

8. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 5.

9. Піпетуйте 100 мкл суміші Хромоген/Субстрат у кожен 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.

10. 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.

11. 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). Бланкування не є обов'язковим.

Важливі зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. 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

Метод	Операції
Розведення зразка	50 мкл + 1 мл DILSPE
Розчинник для аналізу (DILAS)	50 мкл/лунку
Розведені зразки	200 мкл/лунку
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
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл
3-я інкубація	15 хв.
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл
Зчитування ОЩ	450 нм/620-630 нм

Нижче наведено приклад схеми видачі:

	Мікропланшет											
	Модуль 1				Модуль 2				Модуль 3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	Зразок 1				Зразок 9				Зразок 17			
B	Зразок 2				Зразок 10				Зразок 18			
C	Зразок 3				Зразок 11				Зразок 19			
D	Зразок 4				Зразок 12				Зразок 20			
E	Зразок 5				Зразок 13				Зразок 21			
F	Зразок 6				Зразок 14				Зразок 22			
G	Зразок 7				Зразок 15				Зразок 23			
H	Зразок 8				Зразок 16				Зразок 24			

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Див. таблицю нижче:

Перевірка	Вимоги
Негативний контроль*	OD < 0.200 у всіх лунках модуля
Позитивний контроль*	OD > 0.500 принаймні в лунці, покритій рекомбінантним Нуклеокапсидом (С)
Лунки «N»	OD < 0.250

Примітка*: У разі аналізу Контролю якості.

Якщо цих значень не буде досягнуто, аналіз вважається недійсним.

Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань обчислюють за допомогою граничного значення cut-off, визначеного за такою формулою для значення OD 450 нм/620-630 нм для лунки N конкретного модуля:

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

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

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразок розглядається для певного антитіла:

Негативний	S/Co < 1
Сумнівний	1 < S/Co < 1.2
Позитивний	S/Co > 1.2

У разі неоднозначного результату повторіть тест, щоб переконатися, що при першому запуску не було допущено помилки. Якщо зразок підтверджується неоднозначним, пропонується забрати у пацієнта новий зразок сироватки/плазми через 4-5 днів, повторити перший скринінговий аналіз, а у випадку позитиву повторити аналіз підтвердження.

Важливі примітки:

1. Підтвердження інфікування COVID-19:

Коли набір використовується не тільки для підтвердження позитивного зразка під час першого скринінгу, але і для підтвердження інфікування COVID-19, в таблиці нижче наводиться Індекс довіри інфікування (що визначає рівень його надійності):

Індекс довіри інфікування	
Дуже високий	Антитіла до всіх 3 антигенів
Високий	Антитіла до Нуклеокапсиду (Core) і Spike 1
Середній	Тільки антитіла до Нуклеокапсиду (Core)

Якщо такий індекс є середнім (лише антитіла до Нуклеокапсиду «Core»), пропонується спостерігати за особою шляхом тестування другого зразка, відібраного через 7-10 днів від першого.

2. Потенційна нейтралізуюча ефективність:

Для того, щоб вказати титр IgG, який був би цікавий для потенційного використання гіперімунної плазми для імунної терапії, пропонується наступна процедура:

- а) Розбавте плазму **1:40**, дозуючи 20 мкл зразка + 800 мкл DILSPE. Змішайте, а потім розведіть далі до **1:80**, змішуючи 300 мкл розведення 1:40 + 300 мкл DILSPE і до **1:160**, змішуючи 300 мкл розведення 1:80 + 300 мкл DILSPE.
- б) Внесіть 50 мкл DILAS у кожен лунку для зразків.
- в) Внесіть по 200 мкл кожного розведення, а потім продовжуйте тестування, як повідомляється у відповідному розділі.

- d) Особи, які виздоровлюють, що мають позитивний результат ($S/Co > 1.1$), в ідеалі з розведенням 1:160 або принаймні з розведенням 1:80, можуть вважатися потенційними донорами гіперімунної плазми.

У будь-якому випадку рекомендується дотримуватись національних нормативних актів та директив, що діють в окремих країнах з цього конкретного питання.

Важливе зауваження: Дотепер не було опубліковано жодної визначеної та затвердженої міжнародної директиви щодо титру антитіл IgG, яка могла б вважати людину (а) «захищеною» від вторинної інфекції або (б) визначити її потенційним донором плазми для терапії.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Підтверджуючий аналіз IgG за конструкцією та принципом просто походить від єдиного тесту ІФА DiaPro на IgG до суміші антигенів Нуклеокапсиду («Core») та Spike.

Антигени, що використовуються у Наборі для підтвердження/типуювання, за визначенням походять з іншого джерела.

Діагностична специфічність:

Специфічність аналізу, яка оцінювалась при дослідженні більше ста зразків плазми, зібраної до і після спалаху COVID-19, і спочатку давала негативні результати на IgG на специфічному ІФА DiaPro, досягла загального значення майже 100%. Хибнопозитивних реакцій не спостерігалось.

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 спостерігалось.

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

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 спостерігалось.

Як видно з відповідного ІФА IgG DiaPro, минулі інфекції SARS-CoV-1 (та MERS) можуть дати позитивний результат через високий рівень генетичної гомології між двома вірусами. Інші штами коронавірусу дають низьку відповідь з огляду на подібність між різними штамми.

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 метод аналізу.

Ті самі потенційні інтерферуючі зразки були насичені зразком, високо позитивним на IgG антигенів Spike до 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 спостерігалось за умови, що зразок був прозорим та не містив 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:

Було проведено дослідження на зразках, зібраних від:

(а) когорти інфікованих пацієнтів в кінці інфекції з негативним результатом ПЛР та чіткими клінічними ознаками повного одужання, (б) нормальної популяції, перевіреної в епідеміологічному дослідженні, та (в) операторів охорони здоров'я в лікарнях COVID-19.

Такий аналіз був проведений на 80 зразках, які раніше мали позитивний результат на IgG у відповідному ІФА; спостерігалась корельована чутливість майже 100%. Насправді у підтвердженні не було виявлено жодного помилково негативного результату.

Коли зразки, зібрані під час перебігу інфекції в послідовні дати від початку появи перших симптомів та позитивного ПЛР, тестували за допомогою підтверджуючого аналізу Dia.Pro, IgG до Spike антигенів з'явилися досить пізно, ніж антитіла до Нуклеокапсиду (Core), і продовжували зростати в значеннях S/Co разом з IgG до Нуклеокапсиду.

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.

S. ОБМЕЖЕННЯ

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

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

