



ИммуноФерментный Анализ

SARS-CoV-2
суммарные антитела
В к л а д ы ш к н а б о р у



SARS-CoV-2 суммарные антитела

Иммуноферментный анализ для **качественного** определения суммарных антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека у пациентов с подозрением на COVID-19

REF
I20052

Состав набора

1x 96 лунок (12 x 8 стрипов, покрытых антигенами)

Только для профессиональной ин-витро диагностики

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Метод	Иммуноферментный анализ
Срок годности	18 месяцев с даты производства
Хранение	2-8°C

НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА набор DIALAB SARS-CoV-2 суммарные антитела предназначен для качественного определения общих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека у пациентов с подозрением на COVID-19. Тест на суммарные антитела SARS-CoV-2 предназначен только в качестве дополнительного индикатора в подозрительных случаях при отрицательных или положительных результатах тестов на наличие нуклеиновых кислот SARS-CoV-2. Результаты тестирования на антитела не должны использоваться в качестве единственной основы для диагностики или исключения инфекции SARS-CoV-2. Он не предназначен для скрининга населения в целом.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Коронавирусы - это большое семейство вирусов, вызывающих заболевания, варьирующиеся от обычной простуды до более тяжелых заболеваний, таких как ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV) и тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV). Новый коронавирус (nCoV) - это новый штамм, который ранее не был идентифицирован у людей.¹

Коронавирусы являются зоонозными, то есть они передаются между животными и людьми.

Детальные исследования показали, что SARS-CoV передается от цветковых кошек людям, а MERS-CoV от верблюдов-дромадеров людям. Известно еще несколько коронавирусов, циркулирующих у животных, но еще не передававшихся человеку.¹

Общие признаки инфекции включают респираторные симптомы, лихорадку, кашель, одышку и затрудненное дыхание. В более тяжелых случаях инфекция может вызвать пневмонию, тяжелый острый респираторный синдром, почечную недостаточность и даже смерть.¹

Стандартные рекомендации по предотвращению распространения инфекции включают регулярное мытье рук, закрывание рта и носа при кашле и чихании, тщательное приготовление мяса и яиц.

Избегайте тесного контакта с теми, кто проявляет симптомы респираторных заболеваний, таких как кашель и чихание.

Серологические тесты могут сыграть решающую роль в борьбе с COVID-19, помогая идентифицировать людей, ранее перенесших инфекцию с развившимся иммунным ответом. Наряду с другими клиническими данными такие тесты помогут определить, что данные пациенты более не подвержены инфекции и могут вернуться к работе. Кроме того, результаты этих тестов могут помочь в выявлении потенциальных доноров так называемой реконвалесцентной плазмы крови, которая может служить возможным лечением для тех, кто серьезно болен COVID-19.²

ПРИНЦИП ТЕСТА

Сэндвич-тест с двойным антигеном. Общая продолжительность теста: **70 минут**

В тесте используются полистирольные стрипы с лунками, покрытые рекомбинантными антигенами SARS-CoV-2, экспрессируемыми в клетках насекомых (**рекомбинантный N-белок, S2-ECD и S1-RBD**). После добавления пробы сыворотки или плазмы на первом этапе инкубации специфические антитела к SARS-CoV-2, если они имеются, захватываются в лунках. Затем лунки промывают для удаления несвязанных белков сыворотки.

Добавляется второй набор рекомбинантных антигенов (**рекомбинантный N-белок, S2-ECD и S1-RBD**), конъюгированных ферментом пероксидазой хрена (ферментный конъюгат) и экспрессирующих те же эпитопы, что и нанесенные в лунки антигены. Во время второй инкубации они связываются с захваченными антителами.

Затем лунки промывают для удаления несвязанного конъюгата, следом добавляют раствор субстрата. В лунках, содержащих сэндвич-иммунокомплекс “антиген-антитело-антиген” (HRP), бесцветные хромогены гидролизуются связанным ферментным конъюгатом, образуя продукт синего цвета. Синий цвет становится желтым после остановки реакции серной кислотой (стоп-раствор). Интенсивность цвета может быть измерена, она пропорциональна и количеству антител, захваченных в лунках, и количеству антител в образце соответственно. Лунки, содержащие образцы, отрицательные на антитела к SARS-CoV-2, остаются бесцветными.

РЕАГЕНТНЫЙ СОСТАВ

Микроплашка с покрытием	8 x 12 стрипов, 96 лунок Покрывается рекомбинатными антигенами SARS-CoV-2 (вкл., белки N, S2-ECD, S1 и S1-RBD)
Ферментный конъюгат	1 флакон, 11 мл HRP (пероксидаза хрена) меченая рекомбинатными антигенами SARS-CoV-2 (вкл., белки N, S2-ECD, S1 и S1-RBD). Содержит консервант 0.1% ProClin-300.
Положит. контроль	1 флакон, 1.0 мл
Отрицат. контроль	1 флакон, 1.0 мл
Промывочный буфер	1 флакон, 30 мл (концентрат 20x) PBS-Tween промывочный раствор
Раствор субстрата	1 флакон, 11 мл; готов к использованию TMB (тетраметилбензидин)
Стоп-раствор	1 флакон, 6 мл
Вкладыш в набор	1 шт
Крышки для плашек	2 шт

МАТЕРИАЛЫ ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ

- ☐ Плащечный фотометр для абсорбции на длине волны 450 нм и 620 нм
- ☐ Вошер для плашек
- ☐ Инкубатор
- ☐ Шейкер для плашек
- ☐ Микропипетки и многоканальные микропипетки на 100 и 50 мкл с точностью выше 1.5%
- ☐ Абсорбирующая бумага
- ☐ Дистиллированная или деионизованная вода

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Доведите реагенты до комнатной температуры (**18-25°C**). Проверьте промывочный буфер на наличие кристаллов соли. При наличии кристаллов, нагрейте концентрат до 37°C до их растворения. Разведите промывочный буфер (20X) согласно инструкции по промыванию. Для разведения буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду и только чистые емкости.

Другие реагенты **готовы к использованию**.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора остаются стабильными до срока годности, указанного на этикетке, если хранятся при t 2-8°C. Не замораживайте их. Для сохранения наилучших характеристик набора, не допускайте попадания в реагенты микроорганизмов или химических веществ во время хранения.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- ☐ Перед началом работы внимательно прочитайте этот вкладыш. Данный тест не является
 - ☐ достаточным основанием для постановки диагноза или исключения инфицирования SARS-CoV-2.
- Не предназначен для проведения общего скрининга населения.

- ☐ Только для использования в ин-витро диагностике. Только для профессионального использования.
- ☐ Не взаимозаменяйте реагенты разных лотов или разных производителей. Компоненты набора точно подобраны для обеспечения оптимальных эксплуатационных характеристик теста.
- ☐ Убедитесь, что все реагенты набора находятся в пределах срока годности и принадлежат одному лоту. Никогда не используйте реагенты после истечения срока годности.
- ☐ **Внимание - Критично:** до начала работы доведите реагенты и пробы до комн. темпер. (18-25°C), аккуратно взболтайте реагенты. После использования немедленно верните их в t 2-8°C.
- ☐ Отмеряйте пробу точно в количестве, указанном в процедуре. Несоблюдение этого правила может привести к низкой чувствительности теста
- ☐ Не касайтесь дна лунок; отпечатки пальцев и царапины могут привести к неверному считыванию. При считывании убедитесь, что поверхность плашки сухая, а в лунках нет пузырей.
- ☐ Не давайте лункам высохнуть после промывания. Немедленно переходите к следующему шагу. Избегайте образования воздушных пузырей при добавлении реагентов.
- ☐ Избегайте длительных перерывов между шагами теста. Обеспечьте одинаковые условия для всех лунок
- ☐ Часто калибруйте пипетки для точности дозирования пробы/реагента. Используйте одноразовые индивиду-
☐ дуальные наконечники пипеток для каждой пробы и реагента, чтобы избежать перекрестного загрязнения.
- ☐ Убедитесь, что температура инкубации 37°C.
- ☐ При добавлении пробы не касайтесь наконечником пипетки дна лунки.
- ☐ При измерении фотометром установите длину волны абсорбции 450 нм или 450/630 нм.
- ☐ На ферментную активность ферментного конъюгата могут отрицательно влиять пыль и реактивные химические вещества, такие как гипохлорид натрия, кислоты, щелочи и пр. Не выполняйте тест при наличии данных веществ.
- ☐ При применении полностью автоматического оборудования не накрывайте плашки крышкой. Также можно пропустить шаг выстукивания остатков жидкости из лунок
- ☐ Все образцы человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Для обеспечения личной безопасности строго соблюдайте правила GLP (Надлежащая лабораторная практика). Предупреждение: при производстве отрицательного и положительного контролей набора могут использоваться материалы человеческого происхождения. Эти материалы были специальным образом протестированы и показали отрицательный результат на антитела к ВИЧ 1 и 2, HCV, TP и HBsAg. Однако не существует аналитического метода, который мог бы гарантировать полное отсутствие инфекционных агентов в пробах или реагентах. Поэтому обращайтесь с реактивами и пробами как с потенциально инфекционными. Для стабилизации положительного и отрицательного контролей использовались сыворотки крупного рогатого скота. Бычий сывороточный альбумин (BSA) и фетальные телячьи сыворотки (FCS) получены от животных из географических районов, не пораженных BSE/TSE.
- ☐ Не принимайте пищу, напитки, не курите, не наносите косметику в лаборатории. Не пипетируйте растворы ртом
- ☐ Обращайтесь с химикатами и утилизируйте их в строгом соответствии с GLP (Надлежащей Лабораторной практикой), а так же местными или национальными правилами.
- ☐ Наконечники пипеток, емкости, стрипы и посуду от образцов необходимо автоклавировать Не менее 2х часов при t 121°C либо обработать 10% гипохлорида натрия в течение 30 минут для обеззараживания перед дальнейшей утилизацией. Растворы, содержащие гипохлорид натрия автоклавировать НЕЛЬЗЯ. По запросу предоставляются паспорта безопасности
- ☐ Некоторые реагенты могут быть токсичными, вызывать раздражение или ожоги, или иметь канцерогенное действие. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками, но и этого недостаточно для следующих реагентов: стоп-раствор, раствор субстрата и промывочный буфер
- ☐ Стоп-раствор 1 M H₂SO₄ является кислотой. Используйте его с осторожностью. Немедленно вытирайте места проливов, в случае попадания на кожу или в глаза немедленно промойте водой.
- ☐ 0.1% ProClin-300 используемый в качестве консерванта, может вызывать раздражение кожи. Немедленно вытирайте места разливов, в случае попадания на кожу или в глаза немедленно промойте водой.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- ☐ Собирайте образцы сыворотки в соответствии с установленными медицинскими протоколами.
- ☐ Специальной подготовки пациента не требуется. Данный тест предназначен для работы со свежими пробами сыворотки или плазмы. Венозная кровь должна свернуться естественным образом и полностью – сыворотку/плазму нужно отделить от сгустка максимально быстро, чтобы избежать гемолиза эритроцитов. Работайте с кровью аккуратно, чтобы не допустить ее загрязнения микроорганизмами. Любые видимые твердые частицы в образце должны быть удалены

- центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут при комнат. темп. или фильтрованием.
- Можно анализировать пробы плазмы, отобранные с присутствием ЭДТА, цитрата натрия или гепарина, но **высоколипемичные, желтушные или гемолитичные пробы анализировать не следует**, т.к. они могут давать ложные результаты. **Не нагревайте инактивированные пробы.** Это может вызвать ухудшение качества целевого анализата. Никогда не анализируйте пробы с видимым микробиологическим загрязнением.
- Этот ИФА набор предназначен ТОЛЬКО для тестирования индивидуальных образцов сыворотки или плазмы крови. Не используйте его для анализа образцов трупов, слюны, мочи или других жидкостей организма, а также пулированной (смешанной) крови.
- **Транспортировка и хранение:** Храните пробы при $t\ 2-8^{\circ}\text{C}$. Пробы, не подлежащие анализу в течение 7 дней следует заморозить (-20°C или ниже). Избегайте многократных циклов замораживания-оттаивания. При транспортировке пробы должны быть упакованы и маркированы в соответствии с существующими местными и международными правилами перевозки клинических образцов и этологических агентов.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

- Доведите реагенты до комнатной температуры (**$18-25^{\circ}\text{C}$**).
- **Подготовка:** Отметьте две лунки как отрицательный контроль (напр., B1, C1), две лунки как положительный контроль (напр., D1, E1) и одну как холостую (напр., A1, в холостую лунку пробы и ферментный конъюгат не добавляются). Если результаты измеряются фотометром с двойной длиной волны, холостая лунка не обязательна. Используйте только необходимое для теста количество полосок.

1. Добавление пробы	Добавьте 100 мкл положит. контроля и отрицат. контроля и пробы в соответствующие лунки, кроме холостой. Смешайте, аккуратно постукивая плашкой. Для каждой пробы используйте инд. наконечники пипеток, чтобы избежать перекрестного загрязнения.
2. Инкубация	Накрыть плашку крышкой и инкубировать 30 минут при $t\ 37^{\circ}\text{C}$.
3. Промывание	По окончании инкубации снимите и выбросьте крышку плашки. Промойте плашку 5 раз разведенным пром. буфером. Каждый раз замачивайте плашку на 30-60 сек. По окончании всех циклов промывки аккуратно постучите перевернутой плашкой по бумажному полотенцу для удаления остатков жидкости
4. Добавление конъюгата	Добавьте 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, кроме холостой.
5. Инкубация	Накройте плашку крышкой на 30 минут при $t\ 37^{\circ}\text{C}$.
6. Промывание	По окончании инкубации снимите и выбросьте крышку плашки. Промойте плашку 5 раз разведенным пром. буфером. Каждый раз замачивайте плашку на 30-60 сек. По окончании всех циклов промывки аккуратно постучите перевернутой плашкой по бумажному полотенцу для удаления остатков жидкости
7. Окрашивание	Добавьте 100 мкл р-ра субстрата в каждую лунку, вкл. холостую. Инкубируйте плашку в темноте при комн. темп. 10 минут . Ферментативная реакция между р-ром субстрата и конъюгатом фермента дает синий цвет в лунке с положит. контролем и в лунках с пробами положительными к SARS-CoV-2 Ab.
8. Остановка реакции	С помощью мультиканальной пипетки или вручную добавьте 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку и аккуратно перемешать. В лунке с положит. контролем и в лунках с пробами положит. к SARS-CoV-2 Ab развивается интенсивный желтый цвет
9. Измерение абсорбции	Откалибруйте фотометр по холостой лунке и считывайте абсорбцию на 450 нм. Если используется прибор с двойным фильтром, установите эталонную волну на уровне 630 нм. Вычислите пограничную величину и результаты. (Примечание: считывайте абсорбцию в течение 10 минут после остановки реакции).

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОМЫВАНИЮ

- Для получения правильных аналитических данных важно строго соблюдать процедуру промывки.
- Рекомендуется использовать высококачественный промыватель ИФА плашек с наилучшими характеристиками промывки. В целом, не менее 5 автоматических циклов промывки 350-400 мкл/лунка необходимо для того, чтобы избежать ложноположительных реакций и высокого фона.

- ☐ Чтобы избежать перекрестного загрязнения плашки пробами или ферментным конъюгатом, после инкубации не выбрасывайте содержимое лунок, а дайте вошеру аспирировать его автоматически
- ☐ Убедитесь, что каналы дозирования жидкости вошера не забиты и не загрязнены, и в лунки подается достаточный объем промывочного буфера.
- ☐ В случае ручной промывки мы предлагаем провести 5 циклов промывки, дозируя 350-400 мкл/лунка и аспирируя жидкость в течение 5 раз. При подозрении на ложные результаты (высокий фон), увеличьте циклы промывки или время замачивания в лунке.
- ☐ В любом случае жидкость, отсасываемую из стрипов, следует обработать раствором гипохлорита натрия с конечной концентрацией 2,5% в течение 24 часов, прежде чем она будет утилизирована.
- ☐ Перед использованием концентрированный промывочный буфер следует развести 1:20. Если используется меньше целой плашки, приготовьте пропорциональный объем раствора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- ☐ Вычислите среднее значение абсорбции отрицательного контроля (xNC)
- ☐ Рассчитайте пограничное значение по следующим формулам :
 - **положительное пограничное значение = $1.1 \times (xNC + 0.18)$**
 - **отрицательное пограничное значение = $0.9 \times (xNC + 0.18)$**
- ☐ Определите значение пробы в сравнении с оптической плотностью, представленной в таблице :

Интерпретация	Интервал	Результаты
Отрицательный	Получен. знач $\leq$ отрицат погр. знач	В пробе нет антител к SARS-CoV-2
Положительный	Получен. знач $\geq$ полож. погр. знач	В пробе есть антитела к SARS-CoV-2
Погранич. знач	Отриц. погр. знач. $<$ получ. знач. $<$ положит. погр. знач.	Повторно тестируйте пробы в сочетании с другими клиническими тестами.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- ☐ А-значение холостой лунки, содержащей только раствор субстрата и стоп-раствор должно быть < 0.100 при 450 нм.
- ☐ А-значение полож. контроля должно быть ≥ 0.800 на 450/630 нм или на 450 нм после изм. хол. лунки.
- ☐ А-значение отриц. контроля должно быть < 0.100 на 450/630 нм или на 450 нм после изм. хол. лунки.
- ☐ Если одно из А-значений отрицательных контрольных лунок не соответствует критериям контроля качества, то его следует забраковать, а среднее значение пересчитать на основе значений оставшихся отрицательных контрольных лунок. Если А-значение более, чем одной отрицательной контрольной лунки не соответствует критериям контроля качества, то тест является недействительным и должен быть повторен.

Признаки ухудшения качества реагента : Значения положительного или отрицательного контроля, выходящие за пределы указанного диапазона контроля качества, являются индикаторами возможного ухудшения качества реагентов и/или ошибок оператора или оборудования. В этом случае результаты должны быть признаны недействительными и образцы должны быть повторно протестированы. В случае постоянных ошибочных результатов и доказанного ухудшения качества или нестабильности реагентов, немедленно замените их новыми.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- ☐ **Клиническая специфичность**
Исследование 2956 проб с использованием 2 различных ИФА наборов от разных производителей показало, что специфичность набора SARS-CoV-2 суммарные антитела равна 99.52%.

Производители	-	+	Подтвержд полож.	Ложнополож.	Специфичность
DIALAB	2927	29	15	14	99.52%
Другой	2928	28	15	13	99.56%

Клиническая чувствительность

При анализе проб 65 пациентов с подтвержденными положительными результатами на SARS-CoV-2, ИФА набор SARS-CoV-2 суммарные антитела показал положительный результат в 100% случаев

При тестировании согласно эталонам производителя соблюдаются следующие стандарты : коэффициент соответствия положительного эталона P1 равен 1/1; коэффициент соответствия отрицательного эталона N1-N10 равен 10/10. Согласно эталону тестового предела (S1-S5) S1-S3 должен быть положительным, S4-положительным или отрицательным, а S5-отрицательным. Коэф. отклонения не выше 15%.

Аналитическая специфичность

- Перекрестная реактивность не наблюдалась с пробами положительными к RSV Ab и MP Ab.
- Влияния ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл не наблюдается
- На эксплуатационные характеристики этого анализа не влияют повышенные концентрации билирубина, гемоглобина и триолеина.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пробы при клинических испытаниях показали опт. плотн. 0.220 – 2.812 для положительных значений и 0.040 – 0.180 для отрицательных значений. Эти значения не должны использоваться вместо интерпретации результатов расчета.

ОГРАНИЧЕНИЯ

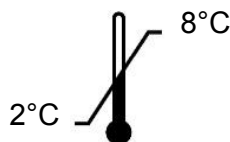
- Этот тест является качественным. Он не является достаточным для постановки диагноза и назначения лечения. Инфицирование новым коронавирусом (COVID-19) должно подтверждаться клиническими признаками в сочетании с другими тестами.
- В первую неделю или через четыре недели после инфицирования новым коронавирусом (COVID-19) результаты на IgM м.б. отрицательными. Также отрицательные результаты могут быть получены на пробах пациентов с низким иммунитетом или заболеваниями, ослабляющими иммунную функцию, недостаточностью системных органов и принимающими препараты, подавляющие иммунную функцию.
- Бактериальное или грибковое загрязнение проб сыворотки или реагентов, или перекрестное загрязнение между реагентами может привести к ошибочным результатам.
- Вода, деионизированная полиэфирными смолами, может активировать фермент пероксидазы хрена.
- Отрицательные результаты не исключают заражения SARS-CoV-2, особенно у тех, кто контактировал с вирусоносителем.
- Для исключения инфекции у этих лиц следует рассмотреть возможность последующего тестирования с молекулярной диагностикой.
- Результаты тестирования на антитела не являются единственной основой для диагностики или исключения инфекции SARS-CoV-2 или для информирования о статусе инфекции.
- Положительные результаты могут быть обусловлены прошлым или настоящим заражением штаммами коронавируса, не относящимися к SARS-CoV-2, такими как коронавирус HKU1, NL63, OC43 или 229E

УТИЛИЗАЦИЯ

Реагенты должны утилизироваться в соответствии с местным законодательством.

ЛИТЕРАТУРА

1. <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
2. FDA, Coronavirus (COVID-19) Update: Serological Tests. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-serological-tests>



ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30
e-mail: office@dialab.at