

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ З НЕЙТРАЛІЗУЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ ДО ACE2-RBD

ACE2-RBD Neutralization Assay

Кат. № : ACE2-RBDNEUTR.CE Дата випуску інструкції: 15-02-2022
Версія: 10



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

ІФА для визначення нейтралізуючої активності антитіл проти SARS-CoV-2 шляхом інгібування зв'язування ACE2-RBD у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Ферментний імуноаналіз (ІФА) для визначення інгібуючої активності зв'язування RBD-ACE2, індукованого антитілами до SARS-CoV-2 у плазмі та сироватці людини.

Аналіз призначений для:

- Підтвердження нейтралізуючої активності антитіл до RBD** у пацієнтів, позитивно відновлених з COVID-19, з антитілами до Spike/RBD;
- Тестування донорів людини**, що вилікувались від інфекції COVID-19, позитивних на антитіла до Spike/RBD для генерації гіперімунної плазми, як можливий імунотерапевтичний підхід до захворювання;
- Скринінгу вакцинованих осіб** для забезпечення надійної позитивної імунізації з розвитком нейтралізуючих антитіл IgG до Spike/RBD.

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 пандемія. 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 білок Spike/RBD, білок оболонки, мембранний білок та нуклеокапсидний білок або NCP.

Хоча антитіла до NCP першими з'являються при сероконверсії, антитіла до Spike/RBD, які беруть участь у зв'язуванні рецепторів ACE2, виробляються пізніше під час зараження, вважаються маркером відновлення і, як відомо, мають нейтралізуючий ефект на SARS-CoV-2 блокуючи зв'язування вірусу з рецептором ACE2.

Код продукту ACE2-RBDNEUTR.CE, на додаток до визначення присутності загальних антитіл до RBD («молекула»), надає важливу додаткову інформацію про реальну біологічну активність такої молекули у пригніченні зв'язування RBD SARS-CoV-2 до його рецептора ACE2, таким чином запобігаючи потраплянню вірусу в клітини-мішені.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Інгібування зв'язування між ACE2 та RBD визначається за допомогою ІФА, проведеного на плазмі/сироватці крові, нейтралізуючу дію антитіл яких потрібно виміряти.

Мікропланшети покриті специфічним для SARS-CoV-2 рекомбінантним глікозилізованим RBD.

Зразок інкубують, дозволяючи антитілам до Spike/RBD, якщо вони є, зв'язуватися з таким антигеном.

Після промивання вільний Spike/RBD визначають додаванням біотинильованого антигену рекомбінантного ACE2, а потім послідовно SAV-HRP.

TMB/H₂O₂ генерує колір, якщо жодне антитіло не зв'язується з RBD, тоді як спостерігатиметься сильне пригнічення розвитку кольору у випадку, якщо антитіла до RBD блокують зв'язування з ним міченого біотином ACE2.

Наявність такого антигену у твердій фазі нарешті визначається додаванням SAV-HRP, який зв'язуватиметься з ACE2, якщо нейтралізуючі антитіла відсутні або ні, якщо антитіла блокують нанесений RBD.

Якщо зразок розбавляють послідовно в аналізі, титр може бути розрахований системою, що забезпечує значення нейтралізації.

D. КОМПОНЕНТИ

Продукт містить реактиви для 96 тестів при скринінгу та 12 тестів нейтралізаційного титрування.

Мікропланшет MICROPLATE

1 мікропланшет. 12 смужок по 8 мікролунок, покритих рекомбінантним глікопротеїном Spike/RBD. Пластини запечатані в пакет з осушувачем.

Негативний контроль CONTROL -

1x12 мл (ml)/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить сироватку людини, негативну на антитіла до Spike/RBD, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Контроль використовується також як розчинник зразка у разі титрування нейтралізуючої активності його анти-Спайк/RBD антитіл. Негативний контроль (або **NC**) містить 0 YO03 МО/мл (IU/ml) і **кодується синюватим кольором.**

Позитивний контроль CONTROL +

1x2 мл (ml)/флакон. Готовий до використання контроль. Містить нейтралізуючі антитіла до SARS-CoV-2, 0.09% Na-азид та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Позитивний контроль (або **PC**) можна використовувати для кількісного визначення, він містить 1000 МО/мл (IU/ml) ± 100. **Він кодується рожевим кольором.**

ACE2-біотин CONJ 1

4 ліофілізовані флакони. Флакон містить рекомбінантний мічений біотином ACE2, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфера рН 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 та 0.02% гентаміцину сульфату в якості консервантів. Розчиняється з 4 мл (ml) CONJ 2.

Стрептавідин-HRP CONJ 2

1x18 мл (ml)/флакон. Готовий до використання реактив, **кодований червоним кольором.** Він містить стрептавідин, кон'югований з HRP, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфера рН 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 та 0.02% гентаміцину сульфату в якості консервантів.

Розчинник для аналізу DILAS

1x16 мл (ml)/флакон. Забуферений 10 мМ (mM) Трис розчин, рН 8.0 +/- 0.1, що містить 0.045% ProClin 300, для обробки зразків та контролів в лунках.

Примітка: Після дозування рідини в лунки для контролю та зразків відповідний колір стає темно-синім.

Хромоген/Субстрат SUBS TMB

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

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

Концентрат Промивного буфера WASHBUF 20X

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

Сірчана кислота H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл (ml)/пляшка. Містить 0.3 M (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.

E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (200 мкл (μl) і 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ELISA, здатний забезпечити температуру +37 °C (°C).

6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (m) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

F. 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 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
7. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендуйтеся, 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 поводитися 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 °C (°C) 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.

G. 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 °C (°C) 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 °C (°C) 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.
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 (rpm) 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 °C (°C) лише протягом 48 годин.

H. 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 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишилися, 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. Позитивний контроль містить 1000 ± 100 ВООЗ МО/мл (IU/ml). Позитивний контроль, розчинений і використаний вперше, повинен бути розподілений аліквотами, а потім заморожений при -20...30 °C (°C).

Розчинник для аналізу:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити водою класу ЕІА до 1200 мл (ml) 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 (°C).

Комплекс кон'югату ACE2/SAV:

Змішайте кон'югат 2 на вортексі.

Перед початком тесту розчиніть вміст ліофілізованого ACE2 (CONJ № 1) з 4 мл (ml) Streptavidin-HRP (CONJ № 2). Акуратно перемішайте на вортексі; ця операція є важливою.

Комплекс стабільний **протягом 5 днів при +2..8 °C (°C)**. У цьому випадку подбайте про повернення рідкого комплексу в холодильник відразу після використання. Комплекс також стабільний протягом 1 місяця, заморожений при -20 °C (°C), але після розморожування його потрібно використовувати лише протягом доби. У будь-якому випадку, можливо, розчиніть лише ту кількість флаконів, яка необхідна для розпорядку робочого дня.

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.

Сірчана кислота:

Готова 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 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) 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 М (M) NaOH).

5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл (µl)/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 (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), 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 (°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

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 поломок 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 °C (°C) 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. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
8. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
9. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
10. 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.

Аналіз можна легко автоматизувати на більшості найкращих робочих станцій ІФА, доступних у багатьох діагностичних лабораторіях.

М1. СКРИНІНГОВИЙ АНАЛІЗ:

Скринінговий тест рекомендується в якості першого тесту на антитіла до RBD/Spike у людей, що одужали від COVID-19, та вакцинованих осіб.

1. Приготуйте комплекс кон'югату ACE2-SAV, як повідомляється в розділі Н. Помістіть необхідну кількість лунок у тримач мікролунок.
2. Залиште лунку А1 порожньою для бланкування.
3. Внесіть 50 мкл (μl) Розчинника для аналізу (DILAS) у всі лунки, за винятком бланк-лунки А1.
4. Внесіть 100 мкл (μl) Негативного Контролю (NC) у трьох примірниках, а потім 100 мкл (μl) Позитивного Контролю (PC) в одному примірнику у відповідні лунки.
5. Потім внесіть 100 мкл (μl) зразків у відповідні лунки для зразків.
6. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хв. при +37 °C (°C)**.

Важливі зауваження:

- Лунка А1 використовується для бланкування, тому в лунку А1 піпетують лише суміш Хромоген/Субстрат та Сірчану кислоту. Інші реагенти не вносять у лунку А1.
 - У Ручній Процедурі смужки потрібно запечатувати на кожному етапі додання герметизуючою фольгою, щоб уникнути масивного випаровування на етапі інкубації. Коли набір використовується в поєднанні з автоматизованим процесором ІФА, не використовуйте клейову герметичну фольгу.
7. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, внесенням та відсмоктуванням 350 мкл (μl)/лунку розведеного промивного розчину, як повідомлялося раніше (розділ І.3).
 8. Акуратно перемішайте, а потім піпетуйте 100 мкл (μl) комплексу кон'югату ACE2/SAV^{HRP} у кожну лунку, за винятком лунки А1 для операцій бланкування, та накрийте герметиком. Переконайтеся, що цей рожевий/червоний кольоровий компонент розподілений у всі лунки для зразків та контролів.

Важливе зауваження: Будьте обережні, щоб не торкнутися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, заповненим Комплексом кон'югату. Може статися забруднення.

9. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хв. при +37 °C (°C)**.
10. Промийте мікролунки, як у кроці 7.
11. Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат в кожну лунку, включаючи бланк-лунку. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 10 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

12. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 11, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить негативний контроль та негативні зразки з блакитного кольору на жовтий/коричневий.
13. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, на 450 нм (nm) фільтрі (зчитування) та на 620-630 нм (nm) (віднімання фону).

Важливі зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Відбитки пальців можуть 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.

М2. АНАЛІЗ ТИТРУВАННЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ:

Титрування нейтралізації біоактивності зразка, позитивного в описаному раніше скринінговому аналізі, рекомендується для визначення сили такого антитіла для нейтралізації зв'язування між RBD («вірусом») та його рецептором ACE2.

1. Приготуйте кон'югований комплекс ACE2-SAV^{HRP}, як повідомляється в розділі Н. Помістіть по одній смужці на кожен зразок, який потрібно титрувати, у тримачі мікролунок.
2. Внесіть 100 мкл (μl) Негативного контролю NC у всі лунки смужки (від А до Н).
3. Внесіть 100 мкл (μl) зразка в лунку А і змішайте 5 разів вміст лунки (розведення 1:2) шляхом аспірації/внесення.
4. Внесіть останні аспіровані 100 мкл (μl) у сусідню лунку В і змішайте 5 разів вміст лунки (розведення 1:4) шляхом аспірації/внесення.
5. Повторюйте операцію розведення, доки не буде включена лунка G (розведення 1:128). Викиньте останні 100 мкл (μl) аспірації. Лунка Н, що залишилась, використовується як 100% Контроль Зв'язування (В₀).
6. Внесіть 50 мкл (μl) DILAS у всі лунки; колір лунки змінюється на синій.
7. Повторюйте операції інкубації та операції, про які повідомлялося вище для Скринінгового Аналізу, з пункту № 6 в пункт № 13. Не бланкуйте показання!

Важлива примітка:

Якщо титр зразка перевищує останню точку розведення (1:128) - унеможливаючи надання титру, пропонується застосувати наступний протокол:

- Внесіть 200 мкл (μl) Негативного Контролю (NC) в лунку А, а потім 100 мкл (μl) NC у всі інші лунки смужок (від лунки В до Н).
- Внесіть 20 мкл (μl) зразка в лунку А.
- З новим наконечником, встановленим на 100 мкл (μl), змішайте його вміст за 5 циклів аспірації/дозування (розведення 1:10).
- Аспіруйте 100 мкл (μl) зразка з А та розпочніть розведення, як повідомлялося раніше.
- Новими значеннями розведень є:
1:10 - 1:20 - 1:40 - 1:80 - 1:160 - 1:320 - 1:640
- Потім продовжуйте, як повідомлялося в попередньому протоколі.

М3. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ПІСЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ

Наступна процедура аналізу повинна бути застосована спеціально для визначення **нейтралізуючих антитіл**, що утворюються при вакцинації вакциною, здатною стимулювати вироблення антитіл (IgG, IgA та IgM) до Домену, що зв'язує Рецептор (або RBD) антигену SARS-CoV-2 Spike 1.

Цей метод виключає зразки, титр нейтралізуючих антитіл яких нижче 1:10 або нижче 50 МО/мл (IU/ml), і вказує на тих вакцинованих осіб, для яких вакцина стимулювала хороший або відмінний титр антитіл, здатних запобігти зв'язуванню RBD з ACE2, а отже і від розвитку інфекції.

Необхідно дотримуватися наведеного нижче методу аналізу:

1. Розчиніть ліофілізований антиген ACE2-Біотин (CONJ 1) з 4 мл (ml) CONJ 2, як повідомляється в розділі Н.
2. Внесіть 75 мкл (μl) Розчинника для аналізу (DILAS) у всі лунки, крім А1.
3. Внесіть **25 мкл (μl) NC** (0 МО/мл (IU/ml) на лунку) у лунки В1+С1, а потім 5 разів піпетуйте з/в із зануреним наконечником у DILAS для перемішування. Колір розчину злегка переходить у блідо-блакитно-зелений.
4. Внесіть **10 мкл (μl) PC** (для отримання 400 МО/мл (IU/ml)) у лунки D1 +E1+F1 і перемішайте, як описано вище.
5. Потім внесіть **25 мкл (μl) PC** (1000 МО/мл (IU/ml)) у лунки G1+H1 і перемішайте, як повідомлялося вище.
6. Потім внесіть **25 мкл (μl) зразка** в інші відповідні лунки для зразків (від А2 вперед) і піпетуйте 5 разів вгору і вниз, зануривши наконечник у DILAS, щоб перемішати. Колір розчину злегка переходить у блідо-блакитно-зелений.
7. Внесіть 100 мкл (μl) NC у всі лунки, за винятком А1, яка використовується для бланкування. Колір в лунках змінюється на синій.
8. Накрийте мікропланшет герметиком, обережно струсіть пластину протягом 10-15 секунд, а потім інкубуйте протягом **60 хв. при + 37 °C (°C)**.
9. Прати відповідно до того, що описано в розділі І.3.
10. Акуратно перемішайте комплекс ACE2-RBD на вортексі, а потім розподіліть 100 мкл (μl) у всі лунки, крім А1. Накрийте знову плівкою мікропланшет та інкубуйте протягом **45 хв. при + 37 °C (°C)**.
11. Промийте відповідно до того, що описано в розділі І.3.
12. Внесіть 100 мкл (μl) ТМВ у всі лунки, включаючи А1. Інкубуйте пластину **при кімнатній температурі протягом 10 хв. у темряві**.

13. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної Кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 10, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір негативного контролю та негативних зразків з блакитного на жовтий/коричневий.
14. Зчитайте ОЩ при 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) бланкування в лунці А1.

Важлива примітка: Після вакцинації зазвичай генеруються високі титри антитіл. Щоб отримати виправлену оцінку МО/мл (IU/ml), зразки в цьому випадку слід попередньо розвести 1:10 у Розчиннику для аналізу (наприклад: 20 мкл (μl) зразка + 180 мкл (μl) DILAS). Після змішування на вортексі вносять 25 мкл (μl) розведених зразків. Розраховані МО/мл (IU/ml) розведених зразків на калібрувальній кривій необхідно нарешті помножити на 10, щоб визначити кінцеву МО/мл (IU/ml) у вихідному зразку.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

У таблиці представлена схема скринінгового аналізу:

Скринінговий аналіз			
Крок	Реагенти&Метод	Операції	Лунки
1	DILAS	50 мкл (μl)	Всі, крім А1
2	Негативний контроль (NC)	100 мкл (μl)	B1+C1+D1
3	Позитивний контроль (PC)	100 мкл (μl)	E1
4	Зразки	100 мкл (μl)	F1 →
5	1-а інкубація	60 хв.	
	Температура	+37 °C (°C)	
6	Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування	Всі
7	Комплекс кон'югату	100 мкл (μl)	Всі, крім А1
8	2-а інкубація	45 хв.	
	Температура	+37 °C (°C)	
9	Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування	Всі
10	TMB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)	Всі
11	3-я інкубація	10 хв.	
	Температура	КТ	
12	Сірчана кислота	100 мкл (μl)	Всі
13	Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)	

Нижче наведено приклад схеми дозування для Скринінгового Аналізу:

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: NC = Негативний Контроль PC = Позитивний Контроль S = Зразок

У наступній таблиці представлена схема Титрування Нейтралізації:

Мікропланшет												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2											
B	1:4											
C	1:8											
D	1:16											
E	1:32											
F	1:64											
G	1:128											
H	NC											

Легенда: NC = Негативний Контроль

У таблиці нижче представлена схема методу **спостереження** за вакцинованими особами:

Кількісний аналіз спостереження			
Крок	Реагенти&Метод	Операції	Лунки
1	DILAS	75 мкл (μl)	Всі, крім А1
2	Негативний контроль (NC)	25 мкл (μl)	B1+C1
3	Позитивний контроль (PC → 400)	10 мкл (μl)	D1+E1+F1
4	Позитивний контроль (PC → 1000)	25 мкл (μl)	G1+H1
5	Зразки	25 мкл (μl)	A2 →
6	Негативний контроль (NC)	100 мкл (μl)	Всі, крім А1
7	1-а інкубація	60 хв.	
	Температура	+37 °C (°C)	
8	Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування	Всі
9	Комплекс кон'югату	100 мкл (μl)	Всі, крім А1
10	2-а інкубація	45 хв.	
	Температура	+37 °C (°C)	
11	Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування	Всі
12	TMB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)	Всі
13	3-я інкубація	10 хв.	
	Температура	КТ	
14	Сірчана кислота	100 мкл (μl)	Всі
15	Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)	

Нижче наведено приклад схеми дозування для методу подальшого спостереження за вакцинованими:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S1										
B	0	S2										
C	0	S3										
D	400	S4										
E	400	S5										
F	400	S6										
G	1000	S7										
H	1000	S8										

Легенда: 0 = Негативний Контроль 400 = 10 мкл (μl) PC 1000 = 25 мкл (μl) PC

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

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

Перевірка	Вимоги
Негативний контроль	1500 < Значення OD 450 нм (nm) < 3.000
Позитивний контроль – метод скринінгового аналізу – спостереження за вакцинацією (25 мкл (μl)/лунку)	Co/S > 5 NS% > 60%

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

Під час методів скринінгового аналізу та титрування результати випробувань обчислюють за допомогою граничного значення cut-off, визначеного за такою формулою для середнього значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для Негативного Контролю (середнє NC).

$$\text{середнє NC} / 2 = \text{Cut-off (Co)}$$

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 (ФА), переконайтеся, що для обчислення граничної величини cut-off та

отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Q1. Скринінговий аналіз (якісний)

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення граничного значення Cut-off (Co) та ОЩ зразка OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) (S) або Co/S, згідно з наступною таблицею:

СКРИНІНГОВИЙ АНАЛІЗ

Значення	Нейтралізуючі антитіла
Co/S < 1	Негативний
1 < Co/S < 5	Низькопозитивний
5 < Co/S < 10	Середньопозитивний
Co/S > 10	Високопозитивний

Негативний результат вказує на те, що у суб'єкта не вироблено нейтралізуючих антитіл до антигену Spike/RBD або що їх титр нижче межі виявлення аналізу. Суб'єкт повинен вакцинуватися.

Позитивний результат свідчить про те, що у суб'єкта виробилися нейтралізуючі антитіла до антигену Spike/RBD після вакцинації або природної інфекції SARS-CoV-2.

Низький або середній позитивний результат свідчить про поганий або помірний розвиток нейтралізуючих антитіл. Було б запропоновано щепити особу, коли це можливо, якщо це ще не було зроблено.

Високі позитивні результати свідчать про високий розвиток нейтралізуючих антитіл. Значення Co/S > 10 зазвичай отримують у осіб, які підлягають вакцинації в кінці лікування. Пропонується постійно контролювати значення антитіл RBD/Spike, щоб відстежувати статус антитіл.

Q2. Аналіз титрування (кількісний)

В аналізі титрування, щоб краще співвідноситися з титрами, отриманими в аналізі нейтралізації «in vivo» (VNT або rVNT), значення Co розраховується з лунки Н смужки (Негативний Контроль використовується для розведення зразка) наступним чином:

$$NC/2 = \text{Cut-off (Co)}$$

Результати інтерпретуються, як зазначено в таблиці нижче:

Co/S	Інтерпретація в титруванні
< 1	Негативний для нейтралізуючих антитіл
≥ 1	Позитивний для нейтралізуючих антитіл

Визначте, при якому розведенні (титрі) досягається значення Co/S ≥ 1. Коли таке розведення виявлено, результати інтерпретуються наступним чином:

Розведення	Інтерпретація в титруванні
1:2	Середній титр
1:4	
1:8	
1:16	
≥ 1:32	Високий титр

Особу, що демонструють високе значення титру нейтралізуючих антитіл, можуть вважатися потенційними кандидатами як донори гіперімунної плазми в імунотерапії.

Якщо потрібна **кореляція із системою «in vivo»**, застосуйте наступний розрахунок, щоб перетворити титри ІФА на титри VNT або rVNT:

$$\text{Титр ІФА} \times K \approx \text{титр «in vivo»}$$

Значення K=10 було розраховано на основі порівняльних досліджень, щоб забезпечити кореляцію з VNT або rVNT з прийнятним наближенням, незважаючи на те, що ці дві системи досить різні.

Приклад: титр ІФА 1:4 ≈ титр VNT 1:40.

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 IgG до SARS-CoV-2 RBD/SPIKE (приклад тесту підтвердження Dia.Pro код COV19GSPIKE.CE або тесту підтвердження ІФА код COV19CONF.CE) перед формулюванням діагнозу.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- В даний час жодна міжнародна організація (ВООЗ, CDC, NIH та національні МОЗ) не вказує на титр, який антитіла повинні мати, щоб вважати особу «захщеною» від вторинного інфікування.

Q3. Подальший контроль після вакцинації

Обчисліть середнє значення OD450 нм NC, а потім Відсоток Нейтралізації зразка (NS%) за наступною формулою:

$$NS\% = 100 - \left(\frac{OD_{450nm} \text{ Sample}}{\text{mean } OD_{450nm} \text{ NC}} \times 100 \right)$$

Далі дані інтерпретуються, як зазначено у наступній таблиці:

% Нейтралізації (Нзразка %)	Нейтралізуюча активність	ВООЗ МО/мл (IU/ml) діапазон
< 20%	Низька або не реагує (*)	< 10
20% < NS% < 30%	Помірна	10 - 100
30% < NS% < 60%	Хороша	100 - 400
60% < NS% < 100%	Відмінна	> 400

Важливе зауваження (*): У цьому випадку особа повинна бути повторно перевірена в скринінговому аналізі, про який повідомляється в IFU, щоб перевірити, чи є він негативним чи низькорективним для антитіл до RBD SARS-CoV-2. У будь-якому випадку, низькорективні особи, ймовірно, мають ризик зараження SARS-CoV-2.

Важливе зауваження ():** Для аналізів на зв'язування антитіл можна використовувати довільне визначення одиниць зв'язування антитіл (BAU/мл (ml)) для полегшення порівняння аналізів, що виявляють той самий клас імуноглобуліну з тією ж специфічністю (наприклад: анти-RBD IgG, анти-NCP IgG тощо). Коефіцієнт перерахунку 1:1 між МО/мл (IU/ml) та BAU/мл (ml) (1000 МО/мл (IU/ml) відповідає 1000 BAU/мл (ml)) встановлено в офіційній Інструкції із застосування, виданій NIBSC, для Першого міжнародного стандарту ВООЗ щодо SARS-CoV-2 імуноглобуліну (людини), код NIBSC 20/136 (версія 2, від 17.12.2020 р.).

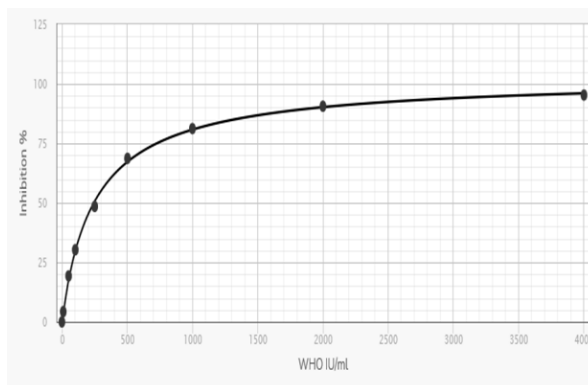
При кількісному визначенні антитіл до RBD в ВООЗ МО/мл (IU/ml) розраховують середні значення OD450 нм (nm) NC, PC400 і PC1000 і використовують систему обробки кривої, щоб намалювати криву «точка-точка», що з'єднує 0 МО/мл (IU/ml), 400 МО/мл (IU/ml) і 1000 МО/мл (IU/ml).

На цій кривій обчислюють концентрацію антитіл в МО/мл (IU/ml) за допомогою їх показів OD450 нм (nm).

Значення нижче 100 МО/мл (IU/ml) і вище 1000 МО/мл (IU/ml) не є точними. Тому для таких значень наводять інтерпретацію:

< 100 МО/мл (IU/ml) та > 1000 МО/мл (IU/ml) відповідно.

Графічне представлення стандартної кривої, отриманої за Міжнародним стандартом ВООЗ для анти-SARS-CoV-2, код NIBSC 20/136 (4-параметрична інтерполяція), подано на малюнку нижче:



Примітка: Не використовуйте це графічне представлення для обчислення результатів зразків.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Витяг з Дизайнерського Досьє, виготовленого для маркування CE, доступний за запитом і повідомляє про всі дослідження, проведені на пристрої, щоб довести його обґрунтованість як IVD для тестування нейтралізуючих антитіл до SARS-CoV-2.

Аналітична чутливість

Перший міжнародний стандарт ВООЗ для анти-SARS-CoV-2, код NIBSC 20/136, який використовується для визначення його граничного розведення, виявляється позитивним (**Co/S** \geq 1) до кінцевої концентрації 15 arb O/мл (U/ml) у скринінговому аналізі.

Діагностична чутливість

Діагностичну чутливість пристрою оцінювали шляхом тестування панелі позитивних до SPIKE/RBD, для IFA від DiaPro код COVID-19GSPiKE.CE. Нижче наводяться результати для двох досліджень (наявних у Дизайнерському Досьє продукту), де було випробувано 150 IgG позитивних зразків.

ІСТИННО ПОЗИТИВНІ	150
ХИБНО НЕГАТИВНІ	0
ВСЬОГО ЗРАЗКІВ	150
ЧУТЛИВІСТЬ%	100

Продукт відповідає призначеній вимозі \geq 98% діагностичної чутливості; значення визначене для всіх інших серологічних маркерів DiaPro Covid-19.

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

Результати для Скринінгового аналізу представлені в таблиці нижче у порівнянні з IFA DiaPro для анти-SPIKE 1&2 IgG (REF):

Зразок №	NEUTR S/Co	REF результат	Зразок №	NEUTR S/Co	REF результат
1	1.3	поз.	20	32.8	поз.
2	2.0	поз.	21	16.3	поз.
3	36.8	поз.	22	51.5	поз.
4	20.6	поз.	23	64.3	поз.
5	29.1	поз.	24	0.5	нег.
6	3.4	поз.	25	0.5	нег.
7	4.7	поз.	26	0.5	нег.
8	38.6	поз.	27	0.5	нег.
9	25.3	поз.	28	0.4	нег.
10	27.1	поз.	29	0.4	нег.
11	8.1	поз.	30	0.4	нег.
12	8.9	поз.	31	0.6	нег.
13	10.8	поз.	32	0.5	нег.
14	8.6	поз.	33	0.5	нег.
15	29.1	поз.	34	0.5	нег.
16	6.0	поз.	35	0.4	нег.
17	8.5	поз.	36	0.5	нег.
18	42.9	поз.	37	0.5	нег.
19	2.9	поз.			

Аналітична специфічність

Перехресну реакційну здатність вивчали, досліджуючи наступне:

- Інші респіраторні інфекційні мікроби та віруси:** допандемічні зразки, що надходять від інфекцій або інших респіраторних вірусів чи бактерій, або вакцинація проти грипу, сертифікована як позитивна на: вірус грипу 1-3 (PIV), грип А, коронавірус людини (hCoV229E, hCoVOC43, hCoV HKU1, hCoV NL63, hCoVHKU1/NL63+), SARS-CoV 1, Риновірус, Респіраторно-Синцитіальний Вірус (RSV), Аденовірус, Парвовірус В19, Вірус Коксакі, *Mycoplasma Pneumoniae*, *Chlamydia Pneumoniae*.
- Непов'язані агенти:** допандемічні зразки, сертифіковані як позитивні на інфекційні агенти, які можуть бути значною мірою в популяції, для якої призначений продукт, наприклад: Вірус герпесу (CMV, EBV та HSV), Токсоплазма, Краснуха, *H.Pylori* ВРС, ВІЛ, Сифіліс, види плазмодію та незначні інші. Зразки тестували, щоб перевірити відсутність інтерференції у виявленні IgG до антигенів SPIKE.

- Відомі найбільш важливі та найчастіші інтерферуючі речовини:** Гемоглобін, Білірубін, Білок, Тригліцериди, Ревматоїдний Фактор, Антинуклеарні Антитіла (ANA), Аутоантитіла (ТРО), IgG до *E. Coli* (для рекомбінантних антигенів, що використовуються для нанесення), вагітні жінки, людські анти-мишачі антитіла, аномальний рівень ферментів печінки та інші загальні специфічні для органів патології.

Результати зведені в таблицях нижче.

Інші респіраторні інфекційні мікроби та віруси (зразки до пандемії)

Категорія	Стать	Вік	ACE2/RBD		
			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	5	0	5
hCoV OC43 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
hCoV HKU1 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
hCoV NL63 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
hCoV HKU1/NL63 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
SARS-CoV 1 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Rinovirus Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
RSV Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Adenovirus Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
M.pneumoniae Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
C.pneumoniae Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5

Не пов'язані мікроби

Категорія	Стать	Вік	ACE2/RBD		
			Кількість тестових зразків	Поз.	Нег.
CMV IgM+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
CMV IgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
EBV EBNA IgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
EBV VCA IgM+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
HSV1&2 IgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Toxo IgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Rub IgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
H.Pylori IgG+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
HCV Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
HIV Ab&Ag +	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
HBsAg+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
HBsAb+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Syphilis Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Malaria Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Coxsackie virus Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5
Parvovirus B19 Ab+	Чоловік&Жінка	25-40	5	0	5

Хибно позитивної реакції не спостерігалось.

Додаткові дослідження щодо потенційних перешкод

Панель із 88 плазм, що зберігали замороженими при - 20 °C (°C) у пакетах, зібраних в 2017 році, розморозили, очистили фільтруванням для видалення видимих частинок фібрину та протестували на приладі. Результати зведені в наступній таблиці:

НЕГАТИВНІ	88
ПОЗИТИВНІ	0
ВСЬОГО ЗРАЗКІВ	88
СПЕЦИФІЧНІСТЬ%	100

Ті самі 88 зразків були протестовані на наявність антитіл до вірусів сімейства герпесу, включаючи EBV та *Helicobacter pylori*, позитивних майже у всіх сироватках та плазмі крові людини, щоб перевірити, чи може їх присутність впливати на аналіз.

Аналіт	Кількість позитивних зразків
HSV 1&2 IgG	88/88
CMV IgG	86/88
VCA IgG	87/88
EBNA IgG	85/88
HP IgG	71/88

Незважаючи на те, що всі 88 зразків у більшості випадків були позитивними у відповідних аналізах, жоден з них не виявився позитивним щодо IgG до Spike, забезпечуючи специфічність > 98%, як вимагають основні вимоги DiaPro відповідно до нашої системи якості CE.

Інтерферуючі речовини

Зразки, отримані до пандемії, що характеризуються наявністю потенційно інтерферуючих речовин, випробовувались до та після «додавання» зразка з високим титром нейтралізації.

Потенційна інтерферуюча речовина	Концентрація	Зразки до «додавання»			Зразки після «додавання»		
		Кількість тестових зразків	Поз.	Нег.	Кількість тестових зразків	Поз.	Нег.
Гіперемоглобін	≥ 500 мг/дл (mg/dl)	5	0	5	2	2	0
Загальний білірубін	≥ 20 мг/дл (mg/dl)	2	0	2	1	1	0
Сироватковий білок	≥ 15 г/дл (g/dl)	2	0	2	1	1	0
Тригліцериди	3000 мг/дл (mg/dl)	4	0	4	2	2	0
РФ+	≥ 2500 О/мл (U/ml)	5	0	5	2	2	0
ANA IgG+		7		7	2	2	0
TPO IgG+		2	0	2	1	1	0
IgG+ до E.Coli		4	0	4	2	2	0
Вагітні жінки	> 3 місяців	11	0	11	2	2	0
Трансамінази	патологічний	2	0	2	1	1	0
Пацієнти на діалізі		2	0	2	1	1	0

Ніяких інтерференцій не спостерігалось у допандемічних інтерферуючих зразках.

Не було виявлено жодних негативних результатів у зразках з «додаванням», що гарантує відсутність інтерференції таких речовин у тестуванні позитивних зразків.

Діагностична специфічність

Було протестовано панель, що складається з 440 сироваток, з попередньо проведеним скринінговим аналізом з негативним IgG до SPIKE/RBD із специфічним ІФА від DiaPro.

Результати повідомляються нижче:

ІСТИННО НЕГАТИВНИ	440
ХИБНО ПОЗИТИВНИ	0
ВСЬОГО ЗРАЗКІВ	440
ЧУТЛИВІСТЬ%	100

Достовірність вимірювання

Повторюваність (внутрішньоаналітичне дослідження) приладу вивчали, досліджуючи 1 прикордонний зразок, наблизений до cut-off, та 1 високопозитивний зразок у тому ж циклі у 16 повторях.

Підсумок результатів подано в таблиці нижче:

	прикордонний	позитивний
СЕРЕДНЄ	0.941	0.101
СТАНДАРТНЕ ВІДХИЛЕННЯ	0.060	0.007
CV%	6.4	6.8

Відтворюваність (інтер-аналіз) визначали шляхом дослідження 1 високопозитивного зразка (НР) з індексом 4.0 < Co/S < 8 та 1 прикордонного зразка (близько 1 Co/S).

Ці зразки досліджували **тричі** в загальній кількості 24 повтори кожен. Результати повідомляються нижче.

Високопозитивний

	Тест 1	Тест 2	Тест 3	
0.102	0.094	0.097		
0.104	0.095	0.101		
0.114	0.094	0.101		
0.100	0.093	0.098		
0.117	0.094	0.100		
0.114	0.094	0.100		
0.109	0.098	0.100		
0.100	0.092	0.103		
				Середні значення
Середнє	0.108	0.094	0.100	0.101
СТАНДАРТНЕ ВІДХИЛЕННЯ	0.007	0.002	0.002	0.003
CV%	6.4	1.9	1.9	3.5 Між

Прикордонний позитивний

	Тест 1	Тест 2	Тест 3	
0.950	0.919	0.987		
0.885	0.885	0.965		
0.933	0.919	1.020		
0.873	0.896	1.021		
0.968	0.938	1.065		
0.998	0.927	0.997		
0.886	0.875	0.993		
0.832	0.857	0.992		
				Середні значення
Середнє	0.916	0.902	1.005	0.941
СТАНДАРТНЕ ВІДХИЛЕННЯ	0.056	0.028	0.030	0.038
CV%	6.1	3.1	3.0	4.0 Між

Нарешті, 40 позитивних зразків, титрованих у VNT у центрі передового досвіду Covid-19, титрувались з набором, і всі отримали позитивні результати щодо нейтралізуючих антитіл з К приблизно 10. Інші 40 негативних зразків негативні в аналізі VNT виявилися негативними з набором.

Результати зведені в таблиці нижче:

ІФА	«in vivo»	
	негативний	позитивний
негативний	40	0
позитивний	0	40

5. ОБМЕЖЕННЯ

При тестуванні заморожених зразків, зокрема тих, які:

- були піддані декільком циклам заморожування та відтавання;
- були вже «брудними» в оригіналі 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 згустків фібрину при розморожуванні;
- зразки IgM, які за своєю природою мають тенденцію до утворення згустків при заморожуванні та розморожуванні та стають «липкими», цілком ймовірно, можуть бути отримані деякі хибні реакції.

Значення в ВООЗ МО/мл (IU/ml), отримані за допомогою цього пристрою, можуть не відповідати МО/мл (IU/ml) або ВАУ/мл (ml) систем, що виявляють антитіла до RBD, а не їх біологічної активності.

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).

4. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N. Engl. J. Med. 382, 727–733 (2020).
5. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 395, 497–506 (2020).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. Walls, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell 180, 281–292 April 16, 2020.
10. Lan, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature 581, 215–220 (2020).
11. Kai-Wang, K. et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis 2020; 20: 565-74.
12. Poh, C.M. et al. Potent neutralizing antibodies in the sera of convalescent COVID-19 patients are directed against conserved linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein. bioRxiv 2020.03.30.015461.

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*

