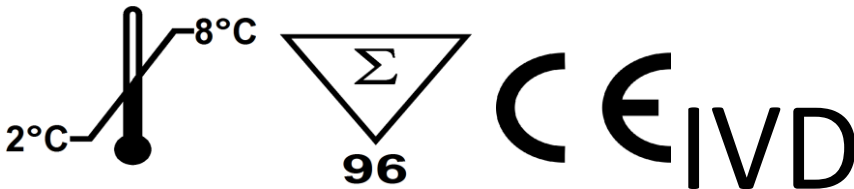




## КОВІД 19 (SARS-CoV-2) IgG ІФА

Каталожний номер No. E-COG-K105



RD-RatioDiagnostics  
Westerbachstraße 47  
60489 Frankfurt  
Germany

Phone: + 49 (0) 69 / 7807  
4942  
Fax: + 49 (0) 69 / 7807 4998  
Email: [info@rd-labs.com](mailto:info@rd-labs.com)  
[www.RD-LABS.com](http://www.RD-LABS.com)

**Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, [info@novamedline.com](mailto:info@novamedline.com), [www.novamedline.com](http://www.novamedline.com)**

### ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Набір RD-RatioDiagnostics COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG ІФА призначена для якісного та напівкількісного виявлення антитіл IgG у сироватці та плазмі крові, зібраних від осіб, які мають ознаки та симптоми інфекції COVID 19 або на вимогу лікаря. Цей ІФА набір створений лише для використання in vitro.

### ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ПОЯСНЕННЯ

Коронавірусна хвороба (COVID 19) - це інфекційне захворювання, спричинене нещодавно відкритим коронавірусом SARS-CoV2, відомим як важкий гострий респіраторний синдром. Вірус SARS-CoV2 генетично схожий з іншими респіраторними коронавірусами людини, включаючи SARS-CoV та MERS-CoV. Через швидке зростання кількості випадків і неконтрольованого поширення захворювання COVID 19 у всьому світі ВООЗ оголосила пандемією. Вірус SARS-CoV-2 належить до сімейства коронавірусів, які отримали назву завдяки короноподібним шипам на їх поверхні. Найчастіше описані

коронавіруси зустрічаються у птахів та ссавців, зокрема кажанів (1-2). Вірус може викликати як легкі симптоми так і важкі респіраторні ускладнення (тобто пневмонію) та смерть. SARS-CoV2 з'явився в Ухані, Китай у грудні 2019 року. Хоча представники охорони здоров'я досі відслідковують точне джерело нового коронавірусу, Ранні гіпотези вважали, що це може бути пов'язано з ринком морепродуктів в Ухані, тому що у деяких людей, які там були, розвинулася вірусна пневмонія, викликана новим коронавірусом.

Інфекція SARS-CoV2 відбувається переважно в дихальних шляхах. В даний час використовуються тести RT-PCR для діагностики великої кількості пацієнтів через їх доступність. Однак діагностика на основі RT-PCR має свої обмеження. Для виявлення SARS-CoV2 за допомогою RT-PCR потрібні високоякісні зразки мазку з носоглотки, які містять достатню кількість інтактною вірусної РНК. Проблеми, пов'язані зі збиранням таких зразків, призвели до великої кількості помилково-негативні результатів тестування (3-4). Продукція антитіл (імуна відповідь) є основним захисним механізмом проти будь-якої вірусної чи бактеріальної інфекції. Імуноглобуліни IgM є першими антитілами, що виробляються у відповідь на вірусні білки (антигени) на початку захворювання. Імуноглобуліни IgG виробляються пізніше, проте зберігаються в організмі протягом певного часу і підтримують специфічну протівірусну реакцію імунної системи. Перевага імуноферментних методів аналізу зразків крові людини на присутність антитіл в можливості визначати наявні та минулі інфекції. Продукція антитіл, насамперед IgG, може відбуватися протягом багатьох років після зараження. Тести-системи ІФА COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM / IgG. дозволяють виявляти не тільки осіб з активними інфекціями, а також тих, хто раніше був заражений вірусом і згодом отримав імунітет. Крім того, підготовка належним чином зразків сироватки або плазми крові для імуноферментного аналізу до тепер створює значно менше проблем, порівняно з отриманням зразків мазку з носоглотки (3).

## ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір тест-системи для визначення COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG створений за методом непрямого твердофазного ІФА. Згідно процедури Калібратори (контролі) і дослідні зразки інкубують у лунках мікропланшету, покритих очищеним рекомбінантним антигеном. Після першої інкубації та промивання у лунки додають кон'югат антитіл до IgG людини з пероксидазою (ферментний кон'югат). Після другої інкубації і промивання у лунки додають розчин субстрату тетраметілбензидіну (ТМБ), а після третьої інкубації додають кислотний стоп розчин і визначають ступінь ферментативної оборотності субстрату шляхом вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі 450 нм, як основний фільтр, і 630 нм, як референтний фільтр. Отримані показники поглинання прямо пропорційні концентрації специфічних до SARS-CoV2 антитіл IgG людини, які присутні у зразках.

## РЕАГЕНТИ

Набір RD-RatioDiagnostics SARS-COV-2 IgG ELISA містить достатню кількість реагентів для 96 лунок. Кожен набір містить наступні реагенти :

Матеріали надані	Кількість	Каталожний номер
SARS-COV-2 Стріпи покриті антигеном	Один планшет	E-COG-10
Концентрат розчину для промивання	Одна пляшка	E-WSL-30
Розчинник зразків	Одна пляшка	E-DLB-40
ТМБ субстрат	Одна пляшка	E-TMB-08
Калібратор 0 (негативний контроль)	Один флакон	E-COG-01
Калібратор 1 (пороговий контроль)	Один флакон	E-COG-02

Калібратор 2 (позитивний контроль) Кон'югат вторинних антитіл Стоп розчин	Один флакон Одна пляшка Одна пляшка	E-COG-03 E-COG-20 E-STP-09
---	---	----------------------------------

### **Матеріали, необхідні, але не надані**

1. Рідер для мікропланшетів, здатний вимірювати поглинання при 450 нм
2. Дейонізована / дистильована вода
3. Точна піпетка для дозування 10 мкл, 100 мкл і 1 мл
4. Полу-автоматична піпетка для дозування 100 мкл
5. Мийка для мікропланшетів (автоматичний вошер)
6. Поглинаючий матеріал для промокання стріпів
7. Інкубатор

### **НАДАНІ РЕАГЕНТИ**

#### **Стріпи покриті антигеном:**

Один тримач стріпів, що містять 12x8 (96) пласкі лунки, покриті очищеним інактивованим антигеном вірусу SARS-COV-2. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Вийміть стріпи які збираєтесь використовувати з упаковки (поліетиленового пакету який вкритий фольгою і містить осушувач силікагель), а невикористані стріпи залишайте в упаковці, яку треба ущільнити для випуску повітря та закрити. Після відкриття продукт стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 ° С.

#### **Концентрат розчину для промивання:**

Одна пляшка, 100 мл, концентрований 10-кратний (10X) сольовий розчин, який містить фосфатний буфер і 0,5 % Бриджу (w/v). Розбавити дейонізованою / дистильованою водою перед використанням. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

#### **Розчинник зразків:**

Одна пляшка, 100 мл, що містить розчин BSA з 0,09% азидом натрію в якості консерванту. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

#### **Калібратори IgG SARS-COV-2:**

Три флакони приблизно по 1,2 мл сироватки людини в 0,01 М фосфатному буфері, що містить BSA з 0,09% азидом натрію в якості консерванту. Калібратор 1 має значення порогового контролю. Значення всіх Калібраторів вказані на етикетках флаконів. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

#### **Кон'югат вторинних антитіл:**

Одна пляшка, 12 мл, що містить моноклональні антитіла до IgG людини, мічені пероксидазою, у розчині фосфатного буферу з 0,02% Прокліном. Зберігати при 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

#### **ТМБ субстрат:**

Одна пляшка, 12 мл, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню, стабілізовані в цитратному буфері, рН 3,8. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

#### **Стоп розчин :**

Одна пляшка, 12 мл, що містить розчин 0,3 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

## **6. Попередження та запобіжні заходи**

Цей тест призначений лише для використання in vitro. Слід дотримуватися таких правил з належної лабораторної практики (GLP):

Не їжте, не пийте, не паліть та не застосовуйте косметику в робочій зоні, де обробляється імунодіагностичний матеріал. Не піпетуйте ротом. При роботі з імунодіагностичними матеріалами носіть лабораторний одяг та одноразові рукавички. Мийте руки ретельно після цього. Накрийте робочу зону одноразовим поглинаючим папером. Витирайте розливи негайно і знезаражуйте забруднені поверхні. Уникайте утворення аерозолів. Забезпечте належну вентиляцію. Використовуйте та утилізуйте всі реагенти та матеріали відповідно до діючих норм.

### **УВАГА: Потенційний біологічно небезпечний матеріал.**

Цей набір може містити деякі реагенти, виготовлені з матеріалів людських та тваринних джерел (наприклад, сироватка, плазма або бичачий альбумін) або використовується спільно з вихідним матеріалом від людини або тварин. Матеріал в цьому наборі було перевірено рекомендованими CE методами та виявлено, що він не реагує на антитіла до ВІЛ-1/2, HCV та HbsAg; також у матеріалі не виявлено будь-яких інфекцій тварин. Жоден доступний метод тестування не може гарантувати усунення усіх потенційних ризиків для повної біологічної безпеки. Обробляти всі реагенти та зразки пацієнтів на 2 рівні біобезпеки, як рекомендується для будь-якого потенційно інфекційного людського матеріалу в Центрах контролю за захворюваннями / Посібник Національного інституту з охорони здоров'я «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», 4-е Видання, квітень 1999.

### **Попередження та запобіжні заходи :**

Деякі реагенти у цьому наборі містять азид натрію як консервант у концентраціях нижче нормативної межі <0,1%. Хоча значно розведений розчин азиду натрію є подразником для шкіри та слизових оболонок і може вступати в реакцію зі свинцевими або мідними трубами у водопровідній мережі, утворюючи вибухонебезпечні азиди металів, особливо якщо накопичується. Крім того, ТМБ і сірчана кислота у концентрованому вигляді також є подразниками для шкіри та слизових оболонок. Ці речовини входять до набору у розведеному стані, що значно мінімізує ризики впливу, але не повністю. Забезпечте належну вентиляцію. Уникайте контакту зі шкірою, очима та одягом. В разі контакту з будь-яким із цих реагентів ретельно промийте водою та зверніться до лікаря. Утилізуйте всі небезпечні реагенти, промиваючи великими обсягами води, щоб запобігти накопиченню хімічних агентів у сантехнічній системі. Для отримання додаткової інформації щодо небезпечних речовин, що містяться в наборі, будь ласка, зверніться до SDS, за запитом.

### **ЗБІР ЗРАЗКІВ І ОБРОБКА**

Для аналізу слід використовувати сироватку та дотримуватися звичайних запобіжних заходів щодо забору крові з вени. Зразки сироватки можна зберігати при температурі 2-8 °С протягом 2 днів. На довший термін зразки сироватки слід зберігати при -20 °С. Не використовуйте гемолізовані або ліпідемічні зразки. Уникайте повторного заморожування та розморожування зразків.

## **ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ**

Для успішного використання тест-набору необхідне глибоке розуміння цієї інструкції, вкладеної в упаковку. Надійні результати будуть отримані лише за допомогою точних лабораторних методів та дотримуючись інструкції. Перед використанням доведіть усі реактиви та зразки до кімнатної температури (~ 25 ° C).

Ретельно перемішайте реактиви та зразки перед використанням обережною інверсією. Не змішуйте різні партії будь-яких компонентів набору в рамках окремого аналізу. Не використовувати будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на його етикетці. Неповне промивання негативно вплине на результат та точність аналізу. Щоб мінімізувати потенційну можливість дрейфу результатів аналізу внаслідок зміни часу інкубації, слід додавати стоп розчин у лунки в тому ж порядку і зі швидкістю як при додаванні розчину ТМБ. Уникайте мікробного забруднення реактивів, особливо кон'югату, промивного розчину та розчинника зразків.

Уникайте забруднення розчину хромогену ТМБ кон'югатом. Для кожного реактиву використовуйте чистий одноразовий наконечник піпетки. Уникайте піпеток з металевими частинами. Контейнери та наконечники для напівавтоматичних піпеток, що використовуються для кон'югату і ТМБ, можуть бути використані повторно за умови їх ретельного промивання деіонізованою / дистильованою водою і висушування після кожного використання. Фермент, що використовується як мітка може інактивуватися під дією кисню, і є дуже чутливим до мікробного забруднення, азиду натрію, гіпохлорної кислоти та ароматичних хлорорганічних сполук, які можуть зустрічатися в лабораторних запасах води. Використовуйте воду високої якості. Уникайте впливу на реактиви надмірного тепла або сонячного світла під час зберігання та інкубації.

## **Приготування реактивів**

### **Миючий розчин:**

Перед використанням Концентрат промивного розчину розбавте 1:10 деіонізованою / дистильованою водою. Якщо присутні кристали, їх слід розчинити при температурі 37 ° C перед розведенням. Налийте 100 мл Концентрату промивного розчину у чисту ємність і розведіть, додавши 900 мл деіонізованої / дистильованої води. Ретельно перемішайте шляхом інверсії. Промивний розчин стабільний протягом 5 днів при кімнатній температурі і 2 тижні при 2-8 ° C при зберіганні в щільно закупореній ємності.

### **Стріпи:**

Виберіть кількість лунок покритих антигеном, достатню для проведення аналізу. Залишок невикористаних стрипів слід помістити у пакет для зберігання з осушувачем і повторно щільно закрити. Пакет повинен бути герметичний для захисту від вологи.

## **Процедура аналізу**

Витримуйте всі зразки та реактиви протягом деякого часу (15-20 хв), необхідного для досягнення кімнатної температури (25 °C). Зразки сироватки та готові до використання Калібратори слід аналізувати у двох примірниках. Калібратор 1 (пороговий контроль) слід аналізувати у трьох примірниках.

1. Визначити лунки, які будуть використані.
2. Розбавити зразки сироватки 1: 101, змішуючи 10 мкл сироватки і 1 мл Розчинника для зразків.
3. Додати по 100 мкл кожного Калібратора (контроля) і розведеного зразка сироватки у відповідні лунки.

4. Інкубувати 30 хвилин при 37 °С.

5. Аспірувати та промивати кожну лунку промивним розчином 4 рази протягом 30 секунд за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Видалити залишки промивного розчину за допомогою абсорбуючого матеріалу.

ПРИМІТКА: Настійно рекомендується використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів. Неповне промивання лунок негативно вплине на точність аналізу. Якщо вошер мікропланшетів недоступний, (а) повністю відсмоктуйте рідину з кожної лунки, (b) додавайте 350 мкл промивного розчину у кожну лунку; (c) повторити кроки (а) та (b) чотири рази.

6. Додати по 100 мкл Кон'югату вторинних антитіл з ферментом у кожну лунку.

7. Інкубувати 30 хвилин при 37 °С.

8. Аспірувати та промивати кожну лунку промивним розчином 4 рази, протягом 30 секунд за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Видалити залишки промивного розчину за допомогою абсорбуючого матеріалу.

9. Додати по 100 мкл ТМБ розчину у кожну лунку, використовуючи точну піпетку.

10. Інкубувати протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.

ПРИМІТКА: Уникайте потрапляння прямих сонячних променів.

11. Додати по 100 мкл Стоп розчину у кожну лунку, використовуючи точну піпетку

12. Визначити оптичну густину (поглинання) розчину у лунках на протязі 30 хвилин, використовуючи рідер для мікропланшетів, фільтр на 450 нм. Якщо доступна функція корекції світлорозсіювання, встановіть прилад на подвійне вимірювання поглинання на довжині хвилі 450 нм і додатково на довжині хвилі 600-620 нм.

## **РЕЗУЛЬТАТИ**

Обчисліть середні значення поглинання для кожного Калібратора та дослідних зразків.

### Якісні результати:

Калібратор 1 має значення порогового контролю.

Якщо поглинання зразка вище, ніж поглинання порогового контролю, зразок позитивний на присутність специфічних IgG.

Обчисліть співвідношення між середнім значенням ОГ для зразка та значенням порогового контролю. Результати тесту визначаються наступним чином:

Позитивний: якщо коефіцієнт співвідношення  $> 1,1$ .

Сумнівний: якщо +/- 10% від значення порогового контролю.

Негативний: якщо коефіцієнт співвідношення  $< 0,9$ .

Якщо результат сумнівний, повторіть тест. Якщо результат залишається сумнівним, візьміть новий зразок сироватки.

### Напівкількісні результати:

Концентрація антитіл IgG проти вірусу SARS-COV-2 у кожному зразку може бути виражена в умовних

одиницях (УОд/мл). Значення концентрації антитіл в УОд/мл позначені на етикетках флаконів з Калібраторами.

Треба побудувати графік залежності середнього значення ОГ для всіх Калібраторів (координата Y) відносно значення їх концентрації в УОд/мл (координата X), а тоді шляхом нанесення на графік середнього значення ОГ зразка потрібно розрахувати концентрацію антитіл в УОд/мл для цього зразка сироватки. Для кожної постановки тесту необхідно побудувати окрему стандартну криву.

Позитивні / негативні результати можуть бути виражені в УОд наступним чином:

Позитивний: концентрація у зразку > 11 УОд/мл

Негативний: концентрація у зразку < 9 УОд/мл

Сумнівний: концентрація у зразку знаходиться в межах від 9 до 11 УОд/мл.

### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Зразок сироватки, отриманий під час гострої фази інфекції, коли присутні лише антитіла IgM, може бути негативним за цією процедурою.
- Результати аналізу слід використовувати разом з інформацією, отриманою після проведення інших клінічних та діагностичних процедур.
- Уникайте повторного заморожування та розморожування реагентів та зразків.
- Слід уникати занадто ліпідемічних, гемолізованих або жовтушних зразків.
- Слід уникати теплової інактивзації сироваток.
- Серологічні дані пацієнтів із ослабленим імунітетом та новонароджених дітей мають обмежене значення

### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Відніміть значення ОГ бланку (показника якості реагентів) від показників ОГ для усіх інших вимірювань. Значення ОГ для Калібратора 1 повинно бути не менше ніж 0,2. Значення ОГ для Калібратора 2 повинно як мінімум у 3 рази переважати показник Калібратора 1.

### ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

#### 1. Чутливість та специфічність

150 зразків сироватки людини, зібраних у клінічній лабораторії, було проаналізовано за допомогою цього ІФА набору на SARS-COV-2 IgG та еталонного ІФА набору. При визначені за допомогою ІФА набору RD-RatioDiagnostics 21 зразок з цієї вибірки був позитивним на антитіла IgG до вірусу SARS-COV-2. Еталонний метод також виявив 21 позитивний зразок. Набір RD-RatioDiagnostics E-COG-K105 має 100% чутливість та 100% специфічність. Аналітичне порівняння результатів тестів показало коефіцієнт кореляції  $R^2 = 0,96$ , що є прийнятним показником для серологічного аналізу.

Результати наведені нижче (див. Табл. 1).

Порівняння аналізів	RD-RatioDiagnostics		
	Позитивний	Негативний	Граничний
Позитивний	21	0	0
Негативний	0	129	0
Граничний	0	0	0

#### 2. Точність

В аналізі				Між аналізами			
Кількість	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка	Кількість	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка

<b>повторів 32</b>			<b>3</b>	<b>повторів 80</b>			<b>3</b>
<b>середнє</b>	<b>0,47</b>	<b>1,01</b>	<b>0,17</b>	<b>середнє</b>	<b>0,315</b>	<b>1,92</b>	<b>0,013</b>
<b>СВ</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,004</b>	<b>СВ</b>	<b>0,004</b>	<b>0,074</b>	<b>0,001</b>
<b>CV%</b>	<b>3,3</b>	<b>2,2</b>	<b>2,1</b>	<b>CV%</b>	<b>1,3</b>	<b>3,8</b>	<b>8,5</b>

### 3. Вплив

Вплив інших компонентів сироватки (ліпідемічної, гемолізованої, жовтушної) не спостерігається до концентрації 5 мг/мл гемоглобіну, 5 мг/мл тригліцеридів та 0,2 мг/мл білірубину.

### 4. Аналітична чутливість

ІФА набір RD-RatioDiagnostics SARS-COV-2 IgG має аналітичну чутливість до 2,3 УО/мл.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Wang G, et al. The progress of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) event in China. J Med Virol. doi: 10.1002/jmv.25705
2. Xiao SY, et al. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. J Med Virol. 2020; 1-4 PMID:32031264 DOI:10.1002/jmv.25702
3. Xie X, et al. Chest CT for typical 2019-nCoV pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing. Radiology. Published online February 12, 2020. 2020;200343. doi:10.1148/radiol.2020200343PubMedGoogle Scholar
4. WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus(2019-nCoV) infection is suspected. Interim guidance, 28 January 2020
5. HHS Publication, 5th ed., 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Available <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>
6. DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
7. Approved Guideline – Procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Kricka L. Interferences in immunoassays – still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037–1038. PMID:10926879
9. Xu W, et al. The diagnostic value of joint detection of serum IgM and IgG antibodies to 2019-nCoV in 2019-nCoV infection. Chinese J Lab Med. 2020;43(00):E012-E012. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20200223-00109 Google Scholar
10. Liu R, et al. The comparative superiority of IgM-IgG antibody test to real-time reverse transcriptase PCR detection for SARS-CoV-2 infection diagnosis. <https://doi.org/10.1101/2020.03.28.20045765>
11. Wang Z, et al. Elevated serum IgM levels indicate poor outcome in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia: A retrospective case-control study. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.20041285>
12. Zheng H, et al. Antibodies in infants born to mothers With COVID 19 pneumonia. JAMA. 2020 Mar 26. doi: 10.1001/jama.