

Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM

ELISA test-kit for the qualitative determination of IgM antibodies to SARS-CoV-2

TK034

96 tests

1. INTENDED USE

The test-kit «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative determination of IgM antibodies to SARS-CoV-2 coronavirus in human serum or plasma. The test-kit might be applied for the ELISA using both automatic pipettes and standard equipment as well as open system automated ELISA analyzers.

2. CLINICAL VALUE

COVID-19 is an infectious disease caused by a new SARS-CoV-2 coronavirus which had not previously been detected in humans.

The viral infection leads to the development of a respiratory flu-like disease with symptoms such as cough and fever. In more severe cases pneumonia can develop. The average incubation period of the COVID-19 is 6.5 days, but it can range from 3 to 21 days.

Coronavirus SARS-CoV-2 is an RNA-containing virus with a characteristic envelope with spikes in the form of a "corona". The main structural proteins of the virus include the nucleocapsid protein and transmembrane S (spike) protein with a receptor-binding domain (RBD), which binds to human cell receptors ACE2, causing infection of the mucosal epithelial cells. Both proteins are highly immunogenic antigens for humans.

Specific antibodies (IgM, IgA, IgG) against the virus appear 7-11th days from the moment of infection and/or contact of the body with the virus. Anti-SARS-CoV-2 IgM antibodies can be detected beginning from day 4 of the first symptoms of the disease. Specific antibodies are detected in less than 40% of patients with COVID-19 during the first week of the onset of symptoms. The levels of these antibodies increase rapidly and are detected in almost all patients by the end of the second week of clinical manifestations. On the 20th day, from the onset of the symptoms of the COVID-19 virus, specific IgG are detected in almost 100% of patients (except for individuals with immunosuppression).

According to some scientific data, there is a clear correlation between the severity of the disease and the level of specific IgG in the blood in the second week of clinical manifestations.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Determination of IgM antibodies specific to SARS-CoV-2 in the test-kit «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» is based on "IgM-capture" solid phase ELISA in a two-step incubation procedure. Microwells are coated with monoclonal antibodies to human IgM. During the first incubation step, IgM antibodies will be bound to the solid phase precoated monoclonal antibodies. The wells are washed to remove unbound components. Recombinant antigens of SARS-CoV-2 (S1 and nucleocapsid), which is conjugated to horseradish peroxidase (HRP), is added next and binds to the specific IgM captured on the solid phase. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are revealed by addition of chromogen solution containing 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide. After 30 minutes the reaction has been stopped, the absorbance values are read using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The colour intensity is proportional to the amount of the specific antibodies present in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

| | | |
|--------------------|------------|--|
| ELISA STRIPS | 1x96 wells | Microplate (12 strips x 8 wells) Each well is coated with monoclonal antibodies to human IgM. The wells can be separated. |
| CONTROL + | 1x0.3 ml | Positive control Solution of conjugated specific antibodies with preservative (pink). |
| CONTROL - | 1x0.5 ml | Negative control Albumin solution with preservative (yellow). |
| SAMPLE DILUENT | 1x12 ml | Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (violet). |
| CONJUGATE SOLUTION | 1x12 ml | Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of recombinant antigens of SARS-CoV-2 conjugated to HRP with stabilizers and preservative (green). |

| | | |
|----------------|---------|--|
| TMB SOLUTION | 1x12 ml | TMB solution (ready to use) TMB, H ₂ O ₂ , stabilizers and preservative (colourless). |
| WASH TWEEN 20X | 1x50 ml | Washing solution Tw20 (20x concentrated) 20X concentrate of PBS buffer with Tween-20 and NaCl (colourless) |
| STOP SOLUTION | 1x12 ml | Stop Solution (ready to use) 0.5 M H ₂ SO ₄ (colourless). |

Adhesive films (2), sera identification plan (1) and instruction for use.

4.2. Material required but not provided

- Variable volume automatic pipettes (10µl–1000µl) and disposable pipette tips;
- plate reader (single wavelength 450 nm or dual wavelength 450/620–695 nm);
- volumetric laboratory glassware (10–1000ml);
- distilled/DI water;
- incubator thermostatically controlled at 37°C;
- automatic/semiautomatic plate washer;
- appropriate waste containers for potentially contaminated materials;
- timer;
- absorbent paper;
- disposable gloves;
- disinfectants;
- protective clothes.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

The ELISA assays are time and temperature sensitive. Strictly follow the test procedure and do not modify it.

- do not use expired reagents;
- do not use for analyses and do not mix reagents from different lots or from test-kits of different nosology as well as other manufacturer's reagents with Vitrotest® kits;

Note: it is possible to use WASH TWEEN|20X, TMB SOLUTION, SAMPLE PREDILUENT and STOP SOLUTION from other Vitrotest® ELISA kits.

- close reagents after use only with appropriate caps;
- control the filling and full aspiration of the solution in the wells;
- use a new tip for each sample and reagent;
- avoid exposure of kit reagents to direct sunlight;
- TMB SOLUTION must be colourless before use. If TMB SOLUTION is blue or yellow it cannot be used. Avoid any contact of TMB SOLUTION with metals or metal ions. Use glassware thoroughly washed and rinsed with distilled/DI water;
- never use the same glassware for CONJUGATE SOLUTION and TMB SOLUTION;

The manufacturer is not responsible or liable for any incorrect results and/or incidents taking place as a result of any violation of the instruction. The manufacturer is not responsible for visual readings of samples (without using a plate reader).

5.2. Safety

- all reagents included in the kit are intended for in vitro diagnostic use only;
- the test-kit is designed for use by qualified personnel only;
- protective clothes, disposable gloves and safety glasses must be worn at all times while performing analysis;
- never eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory;
- never pipette solutions by mouth;
- positive and negative controls do not contain components of human origin;
- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at 121°C for 1 hour;
- dispose of inactivated waste in accordance of national laws and regulations;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- some components of the test-kit contain low concentrations of harmful compounds and could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact of TMB SOLUTION, STOP SOLUTION or CONJUGATE SOLUTION with skin or mucosa, the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;
- in case of spilling of solutions that do not contain acid, e.g. sera, rinse the surface with disinfectant, then dry it with absorbent paper. In other case acid first must be neutralized by sodium bicarbonate and then wiped out as described above.

6. STORAGE AND STABILITY

Reagents are stable until stated expiration date on the label when stored refrigerated (2-8°C). Do not freeze. The kit should be shipped at 2-8°C. Single transportation at the temperature up to 23°C for two days is acceptable.

7. SPECIMEN COLLECTION

The fresh serum or plasma samples can be stored for 3 days at 2-8 °C, or frozen for longer periods at -20 -- -70°C. Frozen samples must be thawed and kept at room temperature for at least 30 minutes before use. Do not use preheated samples. Mix thawed samples thoroughly to homogeneity. Avoid repeated freezing/thawing. Samples containing aggregates must be clarified by centrifugation (3000 rpm for 10-15 min). Do not use hyperlipemic, hyperhaemolysed or contaminated by microorganisms serum specimens. The presence of bilirubin up to concentration of 0.21 mg/ml (361.8 µM/l), haemoglobin up to concentration of 10 mg/ml and triglycerides up to concentration of 10 mg/ml (11.3 mM/l) are allowed.

8. REAGENT PREPARATION

It is very important to keep all test components for at least 30 min at room temperature (18-25 °C) before the assay!

8.1. [ELISA STRIPS] preparation

Before opening the bag with ELISA STRIPS, keep it at room temperature for 30 minutes to avoid water condensation inside the wells. Open the vacuum bag and take out the necessary number of the wells. Once opened the bag with the remaining strips must be resealed with zip-lock immediately and kept refrigerated at 2-8°C for no more than 3 months.

8.2. Washing solution preparation

Check the [WASH TWEEN|20X] for the presence of salt crystals. If crystals have formed, re-solubilise by warming at 37°C, until crystals dissolve (15-20min). Dilute the [WASH TWEEN|20X] 1:20 (1+19) with distilled/DI water before use. For example, 4 ml concentrate + 76 ml water is sufficient for 8 wells. Once diluted it is stable at 2-8°C for 1 week.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Take out from the protective bag the support frame and the necessary number of the wells (the number of specimens + 4 for controls). Place the wells into the frame. Wells with the controls must be included in every test.
- 9.2. Complete the sera identification plan.
- 9.3. Prepare washing solution (see 8.2.).
- 9.4. Dispense 90 µl of [SAMPLE DILUENT] into each well.
- 9.5. Add 10 µl of controls and patient samples to the wells in the following order: A1 – [CONTROL | +], B1, C1 and D1 – [CONTROL | -], other wells – patient samples. Pipette gently to avoid foaming. The colour of the sample diluent changes from violet to blue.
- 9.6. Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
 - aspirate the contents of all wells into a liquid waste container and add immediately a minimum of 300 µl of diluted Washing solution to each well;
 - soak each well for 30 seconds between each wash cycle;
 - aspirate again. The residual volume must be lower than 5µl;
 - repeat the washing step 4 times;
 - after the final washing cycle, turn down the plate onto an absorbent paper and tap it to remove any residual buffer.
- 9.8. Dispense 100 µl of [CONJUGATE SOLUTION] per well. Cover strips with a new adhesive film, incubate for 30 min at 37°C.
- 9.9. Remove and discard the adhesive film and wash all wells five times as described above (see 9.8).
- 9.10. Dispense 100 µl [TMB SOLUTION] into all wells. Do not touch the walls and bottoms of the wells to avoid contamination.
- 9.11. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark. Do not use adhesive film in this step.
- 9.12. Add 100 µl [STOP SOLUTION] to each well in the same order and at the same rate as for [TMB SOLUTION].
- 9.13. Read the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm using a microplate reader within 5 minutes after adding the [STOP SOLUTION]. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement in the single-wave procedure at 450 nm is possible. Reserve blank well to adjust spectrophotometer in such analysis. Only [TMB SOLUTION] and [STOP SOLUTION] must be added in blank well.

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the mean absorbance value for 3 negative controls (Nc), Cut off value (CO) and Sample Index of Positivity (IP_{sample}),

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = Nc + 0.2; \quad IP_{sample} = OD_{sample}/CO$$

10.2. Validation of the test

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

| | |
|-----------|---|
| CONTROL + | OD \geq 1.200 |
| CONTROL - | OD \leq 0.150 |
| CONTROL - | $Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$ |

If one of the negative control absorbances does not match the above criteria, this value should be discarded and a mean value should be calculated using the other two values. If more than one negative control absorbance does not meet the criteria, the test is invalid and must be re-tested.

10.3. Interpretation of results

| | |
|---------------------------------|-----------|
| IP _{sample} > 1.1 | POSITIVE |
| $0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$ | DOUBTFUL* |
| IP _{sample} < 0.9 | NEGATIVE |

* If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

The sensitivity of the «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» was evaluated using 52 blood samples from COVID-19 patients confirmed by PCR (1-10 days after hospitalization). Specific IgM antibodies were detected in 36 samples, 6 of which were negative for IgG antibodies to SARS-CoV-2.

In the study of 273 human serum samples that were obtained during the first half of 2019 (before the COVID-19 pandemic), the specificity of the «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» test-kit was 99.3%.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 2 samples with various specific antibody levels in 32-replicate determinations using 1 lot of the test-kit.

| Serum No. | OD _{mean} | IP _{mean} | CV, % |
|-----------|--------------------|--------------------|-------|
| 85 | 0.899 | 4.03 | 3.0 |
| 119 | 1.719 | 7.71 | 3.6 |

Inter assay reproducibility

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 2 samples with various specific antibody levels in 4 ELISA performances during 4 days, in 8-replicate determinations.

| Serum No. | OD _{mean} | IP _{mean} | CV, % |
|-----------|--------------------|--------------------|-------|
| 85 | 0.887 | 3.95 | 3.3 |
| 119 | 1.704 | 7.58 | 3.4 |

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

If the test sample was obtained in the first days after infection IgM antibodies may not be detected. Therefore, a negative result of the test for IgM antibodies to SARS-CoV-2 does not exclude the infection of the patient with the virus. In the presence of clinical manifestations of the disease it is recommended to repeat the test in week using «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM», «Vitrotest SARS-CoV-2 IgA» and «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» test-kits.

Negative test results in immunosuppressed individuals should also be interpreted with caution.

The final diagnosis cannot be established solely on the basis of serological test results. The diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology, as well as the results of other laboratory tests (including PCR).

13. TROUBLESHOOTING

| <i>Possible causes</i> | <i>Solutions</i> |
|---|---|
| <i>High background in all wells</i> | |
| Contaminated washer | Clean the washer head, then rinse it with 30% ethanol and distilled water |
| Low quality water or contaminated water | Use distilled/DI with resistivity $\geq 10 \text{ M}\Omega\text{-cm}$. |
| Using contaminated glassware | Use clean glassware |
| Using chlorine based disinfectants | Use disinfectants without chlorine |
| Using contaminated tips | Use new tips |
| Increased time of incubation or temperature regimen was changed | Follow incubation regimen according to instruction for use |
| <i>High background in a few wells</i> | |
| TMB solution was added more than once | Add TMB solution once |
| Pipette shaft was contaminated with conjugate solution | Clean the pipette; pipette the liquids carefully |
| One the channels of the washer was contaminated | Clean the washer channel, clean the washer |
| <i>OD of the positive control below normal</i> | |
| Conjugate solution/tmb solution was prepared improperly or not added | Run ELISA repeatedly, prepare conjugate solution / TMB solution properly |
| Reduced incubation time in one of the stages | Follow incubation regimen according to the instruction for use |
| <i>Visual colour intensity of the wells does not correspond to optical density</i> | |
| The optical beam or another component of the reader is misaligned or malfunctioning | Test the absorbance reader's performance |

Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM

Иммуноферментная тест-система для качественного определения анти-тел класса IgM к коронавирусу SARS-CoV-2

ТК034

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» предназначена для качественного определения антител класса IgM к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека.

Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Коронавирусная инфекция COVID-19 - это инфекционное заболевание, вызываемое новым коронавирусом SARS-CoV-2, который раньше у людей не обнаруживался.

Влияние этого вируса приводит к развитию респираторного гриппоподобного заболевания с такими симптомами как кашель, лихорадка, в более тяжелых случаях развивается пневмония. Средний инкубационный период при COVID-19 составляет 6,5 суток, а его крайние сроки - от 3 до 21 суток.

Коронавирус SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом с характерной оболочкой с отростками в виде «короны». К основным структурным белкам вируса принадлежит белок нуклеокапсида и трансмембранный S (spike)-белок с рецепторсвязывающим доменом (RBD), который связывается с рецепторами клеток человека ACE2, вызывая инфицирование эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей. Оба белка являются высокоиммуногенными антигенами для человека.

В организме инфицированного человека специфические антитела (IgM, IgA, IgG) против вируса появляются на 7-11-й дни с момента попадания/контакта организма с вирусом. Anti-SARS-CoV-2 IgM антитела могут быть обнаружены начиная с 4 дня от первых симптомов болезни. У пациентов с COVID-19 в течение первой недели появления симптомов специфические антитела выявляются менее чем у 40% пациентов. Уровни этих антител быстро увеличиваются и к концу второй недели клинических проявлений выявляются почти у всех. На 20 день от появления симптомов COVID-19 вирус специфические IgG обнаруживаются практически у 100% пациентов (кроме лиц с иммуносупрессией).

По некоторым научным данным отмечается четкая корреляция между тяжестью болезни и уровнем специфических IgG в крови на второй неделе клинических проявлений.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM, специфичных к SARS-CoV-2, в тест-системе «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» базируется на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулину класса IgM человека. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета иммуноглобулины класса IgM, при условии присутствия в образцах, связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется смесь конъюгатов рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена, которые связываются со специфическими IgM в составе образованных иммунных комплексов на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена, содержащего 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекиси водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4.1. Состав набора

| | | |
|----------------|------------|--|
| ELISA STRIPS | 1x96 лунок | ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулину класса IgM человека. Лунки можно отделять. |
| CONTROL + | 1x0,3 мл | Положительный контроль Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый) |
| CONTROL - | 1x0,5 мл | Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый). |
| SAMPLE DILUENT | 1x 12 мл | Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый). |

| | | |
|--------------------|----------|---|
| CONJUGATE SOLUTION | 1x 12 мл | Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый). |
| TMB SOLUTION | 1x 12 мл | Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). |
| WASH TWEEN 20X | 1x 50 мл | Раствор для промывания Tw20 (20x концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Tween-20 и NaCl (бесцветный). |
| STOP SOLUTION | 1x 12 мл | Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 М H ₂ SO ₄ (бесцветный). |

Клейкая пленка (2), бланк внесения пробы (1) и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- Автоматические пипетки переменного объема на 10-1000 мкл и наконечники к ним;
- спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 нм,
- мерная лабораторная посуда (10-1000 мл);
- деионизированная или дистиллированная вода;
- термостат на 37°C;
- автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер);
- контейнеры для отходов потенциально зараженного материала;
- таймер;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые перчатки;
- дезинфицирующие средства;
- защитная одежда.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Соблюдение времени инкубации и температуры является чрезвычайно важным для корректного результата ИФА.

- не использовать компоненты тест-системы по окончании срока годности;
- не смешивать при анализе и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

Примечание: допускается использование **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и **SAMPLE PREDILUENT** других серий.

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- **избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;**
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно вымытую дистиллированной водой посуду;
- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для **CONJUGATE SOLUTION** и **TMB SOLUTION**.

Производитель не несет ответственности за любые некорректные результаты и неблагоприятные случаи, возникшие вследствие нарушений вышеуказанных предостережений. Производитель не несет ответственности за визуальный учет результатов анализа (без использования спектрофотометра).

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре, или гипохлорит-

- том натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121°C в течение 1 часа;
 - утилизацию инактивированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству;
 - не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
 - некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] и [CONJUGATE SOLUTION] на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
 - в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты тест-системы стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, если их хранить при 2-8°C. Не допускается замораживание тест-системы. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается однократная транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки или плазмы крови хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток после забора. Для более длительного хранения образцы хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -70°C. Замороженные образцы перед использованием необходимо разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. Не использовать прогретые образцы. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освободить образец от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 об./мин. в течение 10-15 минут. Не использовать образцы сывороток (или плазмы) с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным ростом. На результаты анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 мг/мл (361,8 мкмоль/л), гемоглобина в концентрации до 10 мг/мл и триглицеридов в концентрации до 10 мг/мл (11,3 ммоль/л).

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно выдержать все реагенты тест-системы при комнатной температуре (18-25°C) в течение 30 минут перед использованием!

8.1. Подготовка ИФА-планшета

Для предупреждения конденсации воды в лунках необходимо открывать [ELISA STRIPS] только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Потом раскрыть вакуумную упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock) при температуре 2-8°C. Хранение таким образом упакованного планшета обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат [WASH TWEEN 20X] 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 мл концентрата + 76 мл воды, что достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в концентрате раствора для промывания, прогреть флакон при 37°C до полного растворения кристаллов (15-20 мин.). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок [ELISA STRIPS] для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 мкл [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 10 мкл контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL -]. В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с фиолетового на синий.

- 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
- удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. В лунки внести по 100 мкл **CONJUGATE SOLUTION**. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл **TMB SOLUTION** в лунки.
- 9.11. Инкубировать стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл **STOP SOLUTION**, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **TMB SOLUTION**.
- 9.13. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратить внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.

*Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION**).*

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП отрицательного контроля (N_c), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}),

$$N_c = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = Nc + 0.2; \quad IP_{sample} = OD_{sample} / CO; \quad \text{где } OD_{sample} - \text{ОП}_{образца}$$

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

| | |
|------------------|---|
| CONTROL + | $OD \geq 1.200$ |
| CONTROL - | $OD \leq 0.150$ |
| CONTROL - | $Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$ |

Если одно из значений ОП отрицательного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают среднее N_c по остальным значениям ОП отрицательного контроля. Если более одного из значений ОП отрицательного контроля не отвечают указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного анализа

10.3. Интерпретация результатов

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| $IP_{sample} > 1.1$ | ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ |
| $0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$ | НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ* |
| $IP_{sample} < 0.9$ | ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ |

*Неопределенные образцы рекомендуются исследовать повторно. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует произвести забор нового образца.

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

При оценке чувствительности тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» на 52-х образцах сывороток крови людей с подтвержденным ПЦР диагнозом COVID-19 (на 1-10 день с момента госпитализации) специфические антитела класса IgM были обнаружены в 36 образцах, 6 из которых были отрицательными на антитела класса IgG к SARS-CoV-2.

В результате исследования 273 образцов сывороток крови людей, которые были получены в течение первого полугодия 2019 (до начала пандемии COVID-19), специфичность тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» составила 99,3%.

11.2. Точность

Повторяемость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для 2 сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторах на одной серии тест-системы.

| № сыворотки | OD _{ср} | IP _{ср} | CV, % |
|-------------|------------------|------------------|-------|
| 85 | 0.899 | 4.03 | 3.0 |
| 119 | 1.719 | 7.71 | 3.6 |

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для 2 сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

| № сыворотки | OD _{ср} | IP _{ср} | CV, % |
|-------------|------------------|------------------|-------|
| 85 | 0.887 | 3.95 | 3.3 |
| 119 | 1.704 | 7.58 | 3.4 |

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

В случае, если исследуемый образец получен в первые дни после инфицирования, то антитела класса IgM могут не выявляться. Поэтому отрицательный результат исследования антител класса IgM к коронавирусу SARS CoV-2 не исключает инфицирования пациента вирусом. При наличии клинических симптомов необходимо провести повторное тестирование пациента через 1 неделю в тест-системах «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM», «Vitrotest SARS-CoV-2 IgA» и «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG».

Также с осторожностью следует интерпретировать отрицательные результаты исследований у лиц с иммуносупрессией.

Окончательный диагноз не может быть установлен только на основании результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать эпидемиологический анамнез пациента, клинические проявления заболевания, а также результаты других лабораторных тестов (в частности, ПЦР исследования).

13. ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

| <i>Возможные причины</i> | <i>Способы устранения проблем</i> |
|--|---|
| <i>Высокий фон в лунках всего планшета</i> | |
| Загрязненный промыватель | Прочистить головку промывателя и промыть 30% раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой |
| Низкое качество или загрязненность воды | Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением ≥ 10 МΩ·см. |
| Использование плохо вымытой посуды | Использовать химически чистую посуду |
| Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор | Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства |
| Использование загрязненных наконечников | Использовать новые наконечники |
| Увеличено время инкубации или изменен температурный режим | Придерживаться режима инкубации согласно инструкции по применению |
| <i>Высокий фон в отдельных рядах</i> | |
| Повторное внесение раствора ТМБ | Раствор ТМБ вносить один раз |
| Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата | Прочистить пипетку и осторожно набирать раствор |
| Загрязнен один из каналов промывателя | Прочистить канал промывателя, промыть вошер |
| <i>Значение ОП положительного контроля ниже установленной границы</i> | |
| Неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ) | Повторно провести ИФА, обратить внимание на приготовление этих реагентов |

Сокращено время инкубации на одном из этапов

Проводить инкубацию согласно инструкции по применению

Интенсивность окрашивания лунок не отвечает полученной ОП

Смещен оптический луч

Проверить корректность работы ридера

ЛИТЕРАТУРА

1. Juanjuan Zhao Jr., Quan Yuan et. al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. // Clinical Infectious Diseases., - 2020 Mar. 20 doi:10.1093/cid/ciaa344.
2. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases // WHO. Interim guidance 19 March 2020. WHO reference number: WHO/COVID-19/laboratory/2020.5.
3. Marco Cascella ; Michael Rajnik et.al. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). // NCBI Bookshelf. StatPearls Publishing; 2020 – P.16.
4. Patrick C. Y. Woo, Susanna K. P. Lau. et.al. Differential Sensitivities of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Spike Polypeptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein ELISA for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. // J. Clin. Microbiol., - 2005 – V. 43 N.7 - p. 3054–3058.
5. Quan-Xin Long, Bai-Zhong Luet et. al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. // Nature Medicine., - 2020 April 29 doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
6. Quan-xin Long, Hai-jun Deng et.al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. // medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038018>.
7. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel corona virus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. // J Med Virol., - 2020 - 92(5) – p.464-467. doi: 10.1002/jmv.25702. Epub 2020 Feb 17.
8. Wu, L.-P., Wang, N.-C. et.al. (2007). Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome. // Emerging Infectious Diseases, - 2007 - 13(10) - p.1562-1564.



Catalogue number / Номер по каталогу



Consult instructions for use / Обратитесь к инструкции по применению



In vitro diagnostic medical device / Медицинское изделие для диагностики in vitro



Manufacturer / Производитель



Caution, consult accompanying documents / Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Contains sufficient for <n> tests / Содержимого достаточно для (n-) количества тестов



Mark of conformity to the technical regulations / Знак соответствия техническим регламентам



Temperature limitation / Температурный диапазон



Batch code / Код партии



Use by / Использовать до



Date of manufacture /Дата изготовления



Keep away from direct sun light / Не допускать воздействия солнечного света



Authorized representative in the European Community / Уполномоченный представитель в ЕС

Inst_SARS-CoV-2_IgM_TK034_V03
Edition 3rd, 02.07.2020.

Редакция 3 от 02.07.2020г.

For questions and suggestions regarding the kit, contact the manufacturer:

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103, Украина
tel.: +38(044)222-76-72,

e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua

Vitrotest Sp. z O.O.

Grunwaldzka Al. 472, Gdansk, 80-309, Poland

tel.: +48-88-2950379, e-mail: info@vitrotest.pl



Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM

ASSAY PROCEDURE



Keep all reagents and specimens for at least 30 min at 18-25°C before use



Dispense 90µl of [SAMPLE DILUENT] (violet colour) into the wells of [ELISA STRIPS] in the following order:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 and other wells – patient samples

(colour changes from violet to blue)



Cover wells with an adhesive film, incubate for 30 min at 37°C



Rinse the wells 5 times with diluted 1:20 (1+19) washing solution Tween-20 (300µl per well)



Add 100µl of [CONJUGATE SOLUTION] into the wells

(green colour)



Cover wells with an adhesive film, incubate for 30 min at 37°C



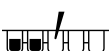
Rinse the wells 5 times with diluted 1:20 (1+19) washing solution Tween-20 (300µl per well)



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



Cover wells with an adhesive film, incubate for 30 min in the dark at 18-25°C



Add 100µl of [STOP SOLUTION]

(colour changes from blue to yellow)



Determine the optical density (OD) at 450/620-695nm

CALCULATION

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = Nc + 0.2;$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}} / CO;$$

Nc - OD_{mean} for 3 [CONTROL -]

CO - Cut off, IP- Index of Positivity

INTERPRETATION

| | |
|--|----------|
| $IP_{\text{sample}} > 1.1$ | POSITIVE |
| $0.9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1.1$ | DOUBTFUL |
| $IP_{\text{sample}} < 0.9$ | NEGATIVE |