

SARS-CoV-2 S IgG ELISA
Naudojimo instrukcija

Rinkinys skirtas in vitro diagnostikai ^[VD]

Katalogo nr.	Specifiniai antikūnai	Ig klasė	Substratas	Formatas
EI-2020-9499 G	SARS-coronavirus-2 (SARS-CoV-2 S)	IgG	Antigenų padengti mikroplokštelės šulinėliai	96 x 1 (96 šulinėliai)



1. Testo paskirtis

SARS-CoV-2 S IgG ELISA pusiau kiekybinės imunofermentinės analizės (ELISA, *angl.* – *enzyme-linked immunosorbent assay*) testas skirtas žmogaus IgG klasės antikūnų prieš SARS-CoV-2 virusą nustatymui kraujo serume arba plazmoje su EDTA. Tai – COVID-19 patvirtinimui arba patogeno sukeltos imuninio atsako nustatymui skirti testai. Šis testas naudingas galimų viruso infekcijos protrūkių ir jų masto nustatymui – padeda įvertinti, kokia gyventojų dalis yra susidūrusi su ligos sukėleju – epidemiologiniai duomenys. Produktas sukurtas diagnostikai ^[VD].

Pastaba. Testas tiesiogiai nenustato viruso. Nustato virusui arba vakcinai specifinius antikūnus ir pateikia informaciją apie imuninės sistemos atsaką į viruso infekciją arba vakciną.

2. Klinikinė serologinio testo reikšmė

Siekiant suvaldyti SARS-CoV-2 viruso plitimą ir pasirengti pakartotiniams jo protrūkiams, labai svarbu žinoti, ar susiformavo imuninis atsakas į virusą. Serologiniai tyrimai, kurių metu nustatomai virusui specifiniai antikūnai, pateikia informaciją apie imuninės sistemos atsaką į koronaviruso infekciją ar vakciną. SARS-CoV-2 atveju tokie tyrimai yra pagalbinė priemonė diagnostikai ir yra rekomenduojami buvusio kontakto su virusu vertinimui pacientams su tipiniais COVID-19 ligos simptomais ir tiems, kuriems simptomai nepasireiškia (besimptomė forma).

Antikūnų prieš SARS-CoV-2 virusą susidarymo dinamika kol kas nėra pakankamai iširta, tačiau žinoma, kad daugumai SARS-CoV-2 virusu užsikrėtusių asmenų IgM ir IgG antikūnų atsakas pasireiškia vienu metu arba paeiliui praėjus 10–21 dienai po infekcijos ^{1 2 3 4 5 6}. IgM serokonversijos mediana nustatoma 12 dieną po simptomų atsiradimo, IgG – 14 dieną ². Apie 65 d. po simptomų pasireiškimo IgM lygis pradeda kristi, kol pasiekia foninį lygį. Tuo tarpu IgG lygis auga kartu su IgM, tačiau išlieka aukštas keletą mėnesių ir ilgiau ⁷. SARS-CoV-2 virusą neutralizuojantys antikūnai 79 % atvejų nustatomai 13–20 d., 98 % – 28–41 d. po simptomų pasireiškimo ir koreliuoja su nustatomu S baltymui specifinių antikūnų titru ⁸. Todėl antikūnų prieš SARS-CoV-2 virusą nustatymas yra svarbus ir apsauginio imuniteto vertinimui.

3. Antigenas

ELISA plokštelės šulinėliai padengti rekombinantiniu SARS-CoV-2 paviršiaus glikoproteinu S (S baltymas, *angl.* – *spike protein*), neturinčiu transmembraninės dalies.

4. Testo principas

Pirmame testo etape skiesti paciento kraujo mėginiai inkubuojami ELISA plokštelės šulinėliuose su imobilizuotu rekombinantiniu viruso baltymu (antigenu) – SARS-CoV-2 paviršiaus glikoproteinu S. Teigiamų mėginių atveju, virusui specifiniai antikūnai prisijungia prie antigeno. Prisijungę specifiniai IgG

antikūnai nustatomi fermentine žyme (HRP, *angl. – horseradish peroxidase*) pažymėtais antikūnais prieš žmogaus IgG (fermento konjugatu). Fermentas krienų peroksidazė katalizuoja spalvinę reakciją.

Priklausomai nuo antikūnų kiekio mėginiuose susidarę skirtingo intensyvumo tirpalai vertinami spektrofotometriškai – matuojamas optinis tankis (OT).

5. Rinkinio sudėtis 96 x 1 (96)

<i>Rinkinio komponentai</i>	<i>Kamštelio spalva</i>	<i>Kiekis</i>
ELISA plokštelė padengta antigenu , paruošta naudojimui	–	1 (96 šulinėliai)
Skiedimo tirpalas , paruoštas naudojimui	ruda	1 × 120 ml
Plovimo tirpalas , 10× koncentruotas	ruda	1 × 100 ml
Neigiamą kontrolė (NK) , paruošta naudojimui	mėlyna	1 × 400 μl
Teigiamą kontrolė (TK) , paruošta naudojimui	raudona	1 × 300 μl
Fermento konjugatas , 120× koncentruotas	žalia	1 × 200 μl
Fermento substrato tirpalas , 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino tirpalas, paruoštas naudojimui	rudas	1 × 12 ml
STOP tirpalas , 3,6 % sieros rūgšties tirpalas, paruoštas naudojimui	bespalvis	1 × 6 ml
Apsauginė plėvelė	–	3 vnt.
Naudojimo instrukcija	–	1 vnt.
Kokybės kontrolės duomenų lapas	–	1 vnt.

6. Papildomos medžiagos ir įranga, kurių nėra rinkinyje

- Automatinis ELISA plokštelių plovimo prietaisas (rekomenduotina). Plokštelės galima plauti ir rankiniu būdu laikantis saugaus darbo reikalavimų.
- ELISA plokštelių skaitytuvas (parametrai: 450 ir 620 nm bangos ilgiai).
- Kalibruotos pipetės.
- Pipečių antgaliai.
- Dozuojanti pipetė: rekomenduojama fermento konjugato, fermento substrato ir STOP tirpalo pilstymui.
- Distiliuotas arba dejonizuotas vanduo.
- ELISA plokštelės inkubatorius – inkubavimui 37° C temperatūroje.
- Inkubatorius arba vandens vonia rekomenduojama plovimo buferinio tirpalo pašildymui.
- Laikrodis arba laikmatis.

7. Saugojimas ir stabilumas

Rinkinys turi būti saugomas 2–8 °C temperatūroje. **Svarbu!** Rinkinio neužšaldyti.

Neatidarytame rinkinyje, visi testo reagentai stabilūs iki ant pakuotės pažymėtos galiojimo datos.

Jei po atidarymo, reagentai yra saugomi 2–8 °C temperatūroje ir yra sandariai uždaryti, jų stabilumas yra iki ant pakuotės nurodytos datos, nebent instrukcijoje žemiau nurodyta kitaip.

8. Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- Produktą privalo naudoti tik apmokyti klinikinės tyrimų laboratorijos darbuotojai.
- Jei supakuoti reagentai yra akivaizdžiai pažeisti, nenaudokite rinkinio.
- Prieš naudodamiesi gaminiu, atidžiai perskaitykite naudojimo instrukciją. Naudokite tik instrukcijos versiją, pateiktą kartu su produktu rinkinyje.
- Atliekant testą privaloma laikytis instrukcijoje nurodytų tūrių, inkubacijų laiko, temperatūros ir paruošimo etapų.
- Nekeiskite ir nemaišykite IMUNODIAGNOSTIKA reagentų su kitų gamintojų reagentais.
- Laikykitės geros laboratorinės praktikos (GLP) ir saugaus darbo reikalavimų. Kai kuriuose reagentuose yra nedeklaruotų koncentracijų konservantų. Venkite mėginių ir reagentų kontakto su akimis ir oda. Patekus į akis ar ant odos, gerai nuplaukite vandeniu. Pakeiskite arba nuplaukite užterštą aprangą. Nurijus, nedelsiant kreiptis į gydytoją.
- Teigiama ir neigiama kontrolės yra žmogaus kilmės biologiniai mėginiai. Darbai su šiomis kontrolėmis, kaip ir su kraujo mėginiais, rekomenduojama taikyti atitinkamas saugos priemones.

9. Mėginių paruošimas ir stabilumas

Žmogaus serumas arba plazma su EDTA skiedžiami santykiu 1:101 su skiedimo tirpalu. Pavyzdžiui, 10 µl mėginio skiedžiamas 1 ml skiedimo tirpalu.

Mėginius saugoti 2–8 °C iki 14 dienų. Rekomenduojama mėginius skiesti ir naudoti testo atlikimo dieną.

10. Reagentų paruošimas ir stabilumas

Pastaba: visi reagentai turi būti išimti ir laikomi kambario temperatūroje (20–25 °C) 30 min.

Nustatykite inkubatorių mikroplokštelės inkubacijai 37 °C.

- **ELISA plokštelė padengta antigenu.** Paruošta naudojimui. Prieš atidarant apsauginę plokštelės pakuotę, plokštelė turi būti laikoma kambario temperatūroje 30 min. (taip išvengiama drėgmės (kondensato) susidarymo).
- **Kontrolės.** Paruošta naudojimui. Gerai sumaišykite reagentus prieš naudojimą.
- **Fermento konjugatas.** Fermento konjugatas yra 120× koncentruotas. Fermento konjugatas skiedžiamas skiedimo tirpalu: į 12 ml skiedimo tirpalą pilama 100 µl fermento konjugato.
Pastaba: fermento konjugatą ruošti prieš pat naudojimą (atlikimo procedūros 2 žingsnis)
- **Skiedimo tirpalas.** Paruoštas naudoti.
- **Plovimo tirpalas.** Plovimo tirpalas yra 10× koncentruotas. Jei vizualiai matomas kristalizacijos procesas plovimo tirpalo buteliuke, buteliuką reikia pašildyti iki 37 °C ir gerai sumaišyti prieš atliekant skiedimus. Koncentratas skiedžiamas distiliuotu vandeniu (dH₂O) santykiu 1:10 (pavyzdžiui į 900 ml dH₂O įpilti 100 ml plovimo buferinio tirpalo koncentrato). **Pastaba:** paruoštas naudojimui plovimo tirpalas išlieka stabilus saugant 2–8 °C 4 savaites.

- **Fermento substrato tirpalas.** Paruoštas naudoti. Būtina uždaryti buteliuką iš karto po panaudojimo – reagentas jautrus šviesai. Pastaba: mėlynos spalvos substratas netinkamas naudojimui.
- **STOP tirpalas.** Paruoštas naudoti.

11. Atliekų tvarkymas

Pacientų mėginiai, kontrolės ir ELISA plokštelė turi būti tvarkomi kaip galimi infekcijos šaltiniai. Visi reagentai turi būti tvarkomi ir šalinami remiantis vietinėmis laboratorinių atliekų tvarkymo taisyklėmis.

12. Kokybės kontrolė

Kiekvieną kartą atliekant testą gautos TK ir NK išmatuoto optinio tankio (OT) vidurkio ir FK OT reikšmės turi atitikti tai rinkinių serijai pateiktus parametrus. Kokybės kontrolės sertifikatas kartu su nurodytais kokybės kontrolės parametrais yra pridedamas rinkinyje. Jei testo kontrolės neatitinka nurodytų parametru, testo rezultatas vertinamas kaip netikslus ir tyrimą rekomenduojama pakartoti.

13. Atlikimo procedūra

1 žingsnis

13.1. Inkubacija su tiriamuoju mėginiu (serumu arba plazma)

100 µl teigiama, neigiama ir fono kontrole (skiedimo tirpalas) bei paruoštais skiestais tiriamaisiais mėginiais (žr. 9 punktą) užpildomi ELISA plokštelės šulinėliai. Paruošta plokštelė uždengiama apsaugine plėvele inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje.

Rezultatų patikimui padidinti rekomenduojama atlikti du kiekvieno mėginio pakartojimus. Pavyzdinė plokštelės užpildymo schema, 45 mėginių tyrimui, atliekant du pakartojimus, pateikta lentelėje.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FK	M2	M6									M42
B	NK	M2	M6									M42
C	NK	M3	...									M43
D	NK	M3										M43
E	TK	M4										M44
F	TK	M4										M44
G	M1	M5									M41	M45
H	M1	M5									M41	M45

Schemos aprašymas: tiriami 45 mėginiai (M1–M45) atliekant du pakartojimus. Teigiama kontrolė (TK), neigiama kontrolė (NK), testo fono kontrolė (FK). TK, NK, FK yra testo atlikimo ir patikimumo vertinimo priemonės. Jos – privalomos atliekant kiekvieną testą.

13.2. Plovimas

Nuimama apsauginė plėvelė, turinys iškratomas, plokštelė plaunama 4 kartus (atliekami 4 plovimo ciklai) į šulinėlį pilant po 350 µl paruošto (žr. 10 punktą) plovimo tirpalo.

Plovimo tirpalas išskratomas arba išsiurbiamas. Plovimo tirpalo likutis iš plokštelės pašalinamas apvertus ir nusausinus vienkartinį rankšluosčiu.

Plovimas gali būti atliekamas automatinio prietaisu.

2 žingsnis

13.3. Inkubacija su fermento konjugatu

ELISA plokštelės šulinėliai užpildomi po **100 µl** paruošto (žr. 10 punktą) fermento konjugato. Plokštelė uždenžiama apsaugine plėvele inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje.

13.4. Plovimas

Nuimama apsauginė plėvelė. Plokštelė plaunama 4 kartus (atliekami 4 plovimo ciklai) į šulinėlį pilant po **350 µl** paruošto (žr. 10 punktą) plovimo tirpalo.

3 žingsnis

13.5. Inkubacija su substratu

Į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpilama po **100 µl** fermento substrato tirpalo. Užpildyta plokštelė inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje (20–25 °C), vietoje apsaugotoje nuo tiesioginių saulės spindulių.

13.6. Reakcijos stabdymas

Į plokštelės šulinėlius kartu su fermento substrato tirpalu pripildoma po **50 µl** STOP tirpalo.

13.7. Signalo matavimas

Reakcijos metu susidariusios spalvos intensyvumas matuojamas spektrofotometriškai esant 450 nm bangos ilgiui, palyginimui naudojamas 620 nm bangos ilgis.

Matavimą atlikti nedelsiant po STOP tirpalo pridėjimo.

14. Rezultatų įvertinimas

Rezultatų vertinimo metu būtina atsižvelgti į kokybės kontrolės duomenų lapę pateiktus parametrus (žr. Kokybės kontrolės duomenų lapą). Jei gautas rezultatas atitinka kokybės kontrolės OT vertes, toliau atliekamas rezultatų vertinimas. Esant nukrypimams nuo kokybės kontrolės parametru, testas turi būti kartojamas.

Pradžioje apskaičiuojama **testo ribinė vertė (RV)**: prie neigiamos kontrolės OT vidurkio pridama **testo koeficiento vertė 0,9**.

$$RV = NK \text{ OT vidurkis} + 0,9$$

Tiriamųjų mėginių signalo vertinimas

Testo rezultatai (santykinės vertės – SV) apskaičiuojami mėginių OT vidurkį dalinant iš apskaičiuotos testo ribinės vertės.

$$SV = \text{mėginio OT vidurkis} / RV$$

Rezultatų interpretacija:

jei SV ≥ 1,0 – rezultatas teigiamas

jei SV 0,8 – 1,0 – rezultatas ribinis, mėginį testuoti dar kartą

jei SV < 0,8 – rezultatas neigiamas

Kokybės kontrolė

Testas laikomas patikimu, jeigu:

Neigiamų kontrolių (NK) OT vidurkis < 0,5

Teigiamų kontrolių (TK) OT vidurkis > 2,0

Fono kontrolės (FK) OT < 0,1

15. Klinikinis testo apibūdinimas

Siekiant įvertinti sukurtą **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** testo patikimumą ir efektyvumą buvo atlikti palyginamieji tyrimai (validavimas) su skirtingų gamintojų serologiniais testais. Testų validavimui buvo panaudoti kraujo plazmos mėginiai (n=210) pagal Vilniaus Regioninio bioetikos komiteto leidimą (Nr.2020/5–N2-1231-710). Sukurtieji testai buvo lyginami su CE IVD ELISA (ELISA_testas_1) ir serologiniais greitaisiais (Greitasis_testas_1) testais, tiriant teigiamus kraujo mėginius iš pacientų su PGR patvirtinta SARS-CoV-2 infekcija (n=50 mėginiai paimti po 14–51 dienos nuo simptomų pradžios (≥ 14 dienų) ir neigiamus kraujo mėginius, surinktus iki COVID–19 pandemijos (iki 2019–06–01), šiems pacientams SARS-CoV-2 AT–PGR testas nebuvo atliktas (n=160). **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** apibūdinimo rezultatai pateikti **1 lentelėje**. Serologinės diagnostikos testų jautrumas ir specifiškumas buvo įvertinti pagal AT–PGR testų rezultatus.

1 lentelė. SARS-CoV-2 S IgG ELISA jautrumo ir specifiškumo vertinimas.

Palyginamasis testas	AT–PGR		
	SARS-CoV-2 S IgG ELISA	Greitasis_testas_1*	ELISA_testas_1
Tiriamieji ir kt. serologiniai testai			
Jautrumas (n=50), Teisingai teigiami, %	94,00	92,00	92,00
Specifiškumas (n=160) Teisingai neigiami, %	99,38	99,38	98,75
Tikslumas (accuracy)**	99,11	99,01	98,41

* – vertinti specifiniai IgG antikūnai

** – laikant, kad COVID paplitimas 5 %, tai rodo tikimybę, kad testas teisingai klasifikuos mėginius į teigiamus ir neigiamus

Ištyrus 50 pacientų, kuriems AT–PGR metodu nustatytas SARS-CoV-2, mėginius **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** testu, trijuose mėginiuose IgG antikūnų nebuvo, todėl testo jautrumas – 94 % (**1 ir 1A lentelės**).

Nustatyta, kad **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** testas pasižymi didesniu jautrumu (94,0 %) nei **Greitasis_testas_1** (vertinant IgG) ir **ELISA_testas_1** testai nustatant SARS-CoV-2 specifiskus IgG antikūnus (**1 lentelė**).

1A lentelė. SARS-CoV-2 S IgG ELISA jautrumo vertinimas. Pateikiami nesutapimai tarp tirtų mėginių.

Koduotas mėg.nr.	AT-PGR	SARS-CoV-2 S IgG ELISA	Greitasis_testas_1 *	ELISA_testas_1	Dienų skaičius nuo simptomų pradžios	Dienos po teigiamo AT-PGR	Paciento amžius
163	1	0	0	0	51	43	63
181	1	0	0	0	44	36	63
183	1	1	0	0	14	5	60
184	1	0	0	0	40	37	54
Jautrumas (n=50), teisingai teigiami, %		94,00	92,00	92,00			

1 – teigiamas rezultatas; 0 – neigiamas rezultatas

* – vertinti specifiniai IgG antikūnai

Tikėtina, kad SARS-CoV-2 paplitimas Lietuvoje 2019 m. – 0 %, todėl **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** testo specifiškumo įvertinimui naudoti mėginiai (pacientų amžius 18–63 m.) surinkti iki 2019–06–01. Ištyrus mėginius **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** testu, nustatytas 99,38 % specifiškumas (**1 ir 1B lentelė**). Toks specifiškumas nustatytas ir **Greitasis_testas_1** (vertinant IgG). **SARS-CoV-2 S IgG ELISA** specifiškumas didesnis už **ELISA_testas_1** (98,75 %).

1B lentelė. SARS-CoV-2 S IgG ELISA testo specifiškumo vertinimas. Pateikiami nesutapimai tarp tirtų mėginių.

Koduotas mėg.nr.	AT-PGR	SARS-CoV-2 S IgG ELISA	Greitasis_testas_1 *	ELISA_testas_1	Paciento amžius
12	N	0	0	1	50
78	N	0	0	1	44
87	N	0	1	0	21
141	N	1	0	0	19
Specifiškumas (n=160), teisingai neigiami, %		99,38	99,38	98,75	

1 – teigiamas rezultatas

0 – neigiamas rezultatas

N – netikrinta

* – vertinti specifiniai IgG antikūnai

16. Procedūros apribojimai










- Atliekant medicininę diagnozę, serologinio tyrimo rezultatas visada turi būti aiškinamas kartu su klinikiniais paciento simptomais ir kitų tyrimų (tiesioginio patogeno nustatymo) rezultatais. Pvz. neigiamas serologinio tyrimo rezultatas neatmeta ligos buvimo.
- Tinkamas mėginių surinkimas ir laikymas yra labai svarbus testo rezultatams.

- Testo validavimas atliktas anti-SARS-CoV-2 IgG nustatymui tik žmogaus serume arba plazmoje.
- Antikūnų jungimosi ir naudojamo fermento aktyvumas priklauso nuo temperatūros. Todėl inkubacijos žingsniuose rekomenduojama naudoti reguliuojamą termostatą. Kuo aukštesnė kambario temperatūra, tuo didesnės testo reikšmės. Temperatūros poveikis kontrolėms yra toks pat, todėl susidarę pokyčiai didžiąja dalimi kompensuojami apskaičiuojant rezultatą.
- Nepakankamas plovimas gali padidinti testo vertes.
- Plovimo skysčio likutis šulinėliuose pilant substratą gali lemti klaidingai žemas testo vertes.

Literatūra

1. Woelfel, R. *et al.* **Clinical presentation and virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019 in a travel-associated transmission cluster.** *medRxiv* 2020.03.05.20030502 (2020) doi:10.1101/2020.03.05.20030502.
2. Zhao, J. *et al.* **Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019.** *Clin. Infect. Dis.* (2020) doi:10.1093/cid/ciaa344.
3. OKBA, N. *et al.* **SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients.** *Emerg. Infect. Dis.* 2020.03.18.20038059 (2020) doi:10.1101/2020.03.18.20038059.
4. Liu, W. *et al.* **Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs** for Downloaded from. *J. Clin. Microbiol* (2020) doi:10.1128/JCM.00461-20.
5. Long, Q. *et al.* **Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice.** *medRxiv* 2020.03.18.20038018 (2020) doi:10.1101/2020.03.18.20038018.
6. Wan, W. Y., Lim, S. H. & Seng, E. H. **Cross-reaction of sera from COVID-19 patients with SARS-CoV assays.** *medRxiv* 2020.03.17.20034454 (2020) doi:10.1101/2020.03.17.20034454.
7. Stephan Menzel *et al.* **A simple low cost assay for detecting antibodies against the SARS-CoV2 Spike and nucleoprotein.** in *Half-day COVID 19 Antibodies webinar.*
8. Fafi-Kremer, S. *et al.* **Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France.** *EBioMedicine* 59, (2020).

Simbolių reikšmės

	In vitro diagnostikos medicinos priemonė		Pagaminimo data
	CE - paženklinta		Gamintojas
	Produkto gamybos LOT numeris		Katalogo numeris
	Saugojimo temperatūra		Biologinis pavojus
	Tinkamas naudoti iki		