

№ 06/22

Date: 19.01.2022 p.

STATEMENT

We, Vitrotest Bioreagent LLC, having a registered office at M. Boychuka street 18b/56, Kyiv 01103 Ukraine, assign SRL SANMEDICO having a registered office at A. Corobceanu street 7A, apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative.

We declare that the company mentioned above is authorized to register, notify, renew or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

Signature: _____



Director Ihor Nikolaenko Ph.D



СЕРТИФІКАТ

CERTIFICATE * CERTIFICAT * ZERTIFIKAT * СЕРТИФИКАТ * CERTIFICADO

ОРГАН СЕРТИФІКАЦІЇ СИСТЕМ УПРАВЛІННЯ
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ЗАСВІДЧУЄ, ЩО

СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКІСТЮ

ТОВАРИСТВА З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

Юридична адреса: вул. Бойчука, 18-Б, кв. 56, м. Київ,
01103, Україна

Адреса виробництва: вул. Курортна, 11, м. Київ, 04075, Україна

код ЄДРПОУ 42149820

СТОСОВНО
розроблення та виробництва тест-систем імуноферментних

**ВІДПОВІДАЄ ВИМОГАМ
ДСТУ EN ISO 13485:2018
(EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT)**

Сертифікат № UA.C.378—19 в Реєстрі Органу сертифікації
zareєстрований " 25 " листопада 2019 року
чинний до " 24 " листопада 2022 року

Заступник керівника
Органу сертифікації

В.Д. Ример



№ 80020
ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)
вул. Метрологічна, 4, м. Київ, 03143, Україна, тел./факс +38 044 452-67-38
Атестат акредитації НААУ № 80020

Чинність сертифікату можна перевірити на сайті www.certsystems.kiev.ua в розділі
«Послуги / Сертифікація систем управління»

DECLARATION OF CONFORMITY №UA-TK051

Manufacturer:

Vitrotest Bioreagent LLC
State registration № 42149820

Legal address:

M.Boychuka 18b, of.56, Kyiv 01103 Ukraine

Manufacturer's address:

Kurortnaya 11, Kyiv, 04075, Ukraine

Description of the product:

Name	Catalog Number
ELISA test-kit for the determination of antibodies to <i>Ascaris lumbricoides</i> «Vitrotest Anti-Ascaris»	TK051

Classification:

According to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Is not a part of A and B lists, is not a device for self-testing, not for performance assessment.

Conformity assessment procedure:

Annex 3 of medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Vitrotest Bioreagent declares the execution of all demands regarding the device, that was mentioned above, according to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754, and the requirements of further regulations:

ДСТУ EN ISO 13485:2018

ДСТУ EN ISO 14971:2015

ДСТУ EN 13641:2015

ДСТУ EN ISO 15223-1:2018 (EN ISO 15223-1:2016, IDT; ISO 15223-1:2016, Corrected version 2017-03, IDT)

ДСТУ EN ISO 23640:2015 (EN ISO 23640:2015, IDT; ISO 23640:2011, IDT)

The declaration is made under sole responsibility of the manufacturer.

Date of issue: 31.10.2019

Validity of declaration till: 31.10.2024

Director



Ihor Nikolaienko, Ph.D.

Edition 1 from 31.10.2019

СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ на імуноферментну тест-систему для виявлення антитіл до *Ascaris lumbricoides* «Vitrotest Anti-Ascaris»

Серія:	0419	Дата виготовлення:	2019-12-06
Номер за каталогом та варіант комплектації:	TK051 96-1T	Строк придатності:	2020-12-06

Комплектність тест-системи та строк придатності компонентів

Компонент	Колір, кількість та об'єм (або інші характеристики)	Серія	Строк придатності
ІФА-планшет	1 шт.(12 стрипів по 8 лунок), цілісність вакуумної упаковки збережено	0419	2021/02/28
Позитивний контроль	Рожева рідина, мікропробірка з червоно-помаранчевою кришкою, 1×0,3 мл	0419	2021/02/28
Негативний контроль	Жовта рідина, мікропробірка з зеленою кришкою, 1×0,5 мл	0319	2021/03/02
Розчин для промивання Tween20 (20x) (концентрат)	Безбарвна рідина, білий флакон з білою кришкою, 1×50,0 мл	0519	2021/05/21
Розчин для розведення сироваток	Коричнево-зелена рідина, білий флакон з синьою кришкою, 1×12,0 мл	0419	2021/02/22
Розчин кон'югату	Зелена рідина, білий флакон з зеленою кришкою, 1×12,0 мл	0419	2021/02/22
Розчин ТМБ	Безбарвна рідина, чорний флакон з чорною кришкою, 1×12,0 мл	0319	2021/04/18
Стоп-реагент	Безбарвна рідина, білий флакон з червоною кришкою, 1×12,0 мл	0519	2021/05/21
Клейка плівка	У наявності 2 шт.	x	Необмежений
Бланк внесення проб	У наявності 1 екземпляр	x	Необмежений
Інструкція	1 екземпляр (редакція 1)	x	Необмежений

Діагностичні характеристики тест-системи

Показник	Результат контролю	Вимоги нормативної документації
ОГ позитивного контролю (450/620 нм)	2,763 ОО	≥ 1,2 ОО
ОГ негативного контролю (450/620 нм)	0,017 ОО	≤ 0,15 ОО
Чутливість на внутрішньовиробничій панелі сироваток	100 %	100 %
Специфічність на внутрішньовиробничій панелі сироваток	100 %	100 %

Висновок: імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до *Ascaris lumbricoides* «Vitrotest Anti-Ascaris» серії 0419 відповідає вимогам ТУ.У 24.4–36555928–001:2011.

Директор ТОВ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

М.М.Н. Ніколаєнко І.В.

1. INTENDED USE

ELISA test-kit «Vitrotest Anti-Ascaris» is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG antibodies to *Ascaris lumbricoides* 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

Ascariasis is prevalent worldwide, especially in tropical and subtropical countries. The ascariasis pathogen in humans, *Ascaris lumbricoides* is a roundworm of the Nematoda phylum. Adult ascaris parasitizes in the small intestine, has a length of 15-40 cm, a diameter of 5 mm and produces 200 000 eggs per day.

Infections happen when a human swallows water or food contaminated with eggs which hatch into juveniles in the duodenum and enter the blood stream. From there parasites go to the liver and heart and enter the pulmonary circulation to break free in the alveoli, where they grow and molt. In three weeks, the larva passes from the respiratory system to be coughed up, swallowed and thus returned to the small intestine, where it matures to an adult male or female worm.

Often, no symptoms are visible with an *A. lumbricoides* infection. However, in the case of a particularly severe infection bloody sputum, cough, fever, abdominal discomfort, intestinal ulcer and the passing worms can be observed. Ascariasis is also the most common cause of Löffler's syndrome worldwide. Accompanying symptoms include pulmonary infiltration and eosinophilia.

The presence of an infection can be identified by microscopy (detection of eggs in faces) and serology (detection of antibodies by ELISA).

Most diagnoses are made by identifying the appearance of the worm or eggs in faeces. This method is effective when the adult roundworms parasitize in the intestine. During the larvae migration the efficiency of ascariasis diagnosis can be increased with ELISA for the detection of antibodies to helminth antigens. The results of the serological analysis coupled with anamnesis and clinical symptoms facilitate diagnosis of the *Ascaris* invasion at an early stage and enable therapy to begin the before complications of the disease appear.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

«Vitrotest Anti-Ascaris» ELISA is a solid phase, indirect ELISA method for detection of IgG antibodies to *Ascaris lumbricoides* in a two-step incubation procedure. Microwells are coated with *A. lumbricoides* antigens. During the first incubation step, the specific antibodies to *A. lumbricoides*, if present, will be bound to the solid phase precoated antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies, leaving only the specific antigen-antibody complexes. Secondary antibodies (anti-IgG) which are conjugated to horseradish peroxidase (HRP) added next and bind to the immune complexes on the solid phase. Unbound components are removed by washing. Chromogen solution containing 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added. TMB is catalysed by the HRP to produce a blue colour product that changes to yellow after adding stop solution. Absorbance at 450/620-695nm is read using a plate reader. The density of yellow colouration is directly proportional to the amount of the 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 <i>A. lumbricoides</i> antigens. The wells can be separated.
CONTROL +	1x0.3 ml	Positive control Solution of specific antibodies to <i>A. lumbricoides</i> with preservative (pink).
CONTROL -	1x0.5 ml	Negative control Negative human serum with preservative (yellow).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (brown-green).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG 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 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;
- 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 control does not contain of human origin components;
- negative control of test-kit «Vitrotest Anti-Ascaris» was tested and found negative for anti-HIV1/2, anti-HCV, anti-T.pallidum antibodies and HBsAg. Nevertheless, all controls and patient samples should be regarded and handled as potentially infectious;
- 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 (3000rpm for 10-15min). 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. Dispense 10 µl of controls and patient samples into the wells in the following order: A1 – [CONTROL +], B1, C1 and D1 – [CONTROL -], other wells – patient samples. Mix gently to avoid foaming. The colour of the sample diluent changes from brown-green to blue.
- 9.6. Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
- 9.7. At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive film and wash the well 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 5 µl.
 - 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. At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive film and wash the wells five times as described above (see 9.7.).
- 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. Dispense 100 µl [STOP SOLUTION] into all wells 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}),

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = Nc + 0.3; \quad IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}}/CO$$

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

$IP_{\text{sample}} > 1.1$	POSITIVE
$0.9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1.1$	DOUBTFUL*
$IP_{\text{sample}} < 0.9$	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

Relative sensitivity of the «Vitrotest Anti-Ascaris» ELISA kit was 92 % while evaluating it by using of 64 sera positive to *Ascaris lumbricoides* antibodies in other commercial test-kit.

In the comparative studies with other commercial test-kit using 224 negative sera for antibodies to *Ascaris lumbricoides* specificity of the «Vitrotest Anti-Ascaris» was 93.3 %.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 3 samples with various specific antibody levels in 24-replicate determinations using 1 lot of the test-kit.

Serum No.	OD_{mean}	IP_{mean}	CV, %
102L	0.636	1.83	5.3
133L	1.349	3.88	1.0
948	2.593	7.45	1.0

Inter assay reproducibility

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 3 samples with various specific antibody levels in 4 ELISA performances during 4 days, in 8-replicate determinations.

Serum No.	OD_{mean}	IP_{mean}	CV, %
102L	0.637	1.76	3.7
133L	1.329	3.67	2.5
948	2.539	7.01	2.5

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A positive result in the «Vitrotest Anti-Ascaris» indicates the presence of specific antibodies IgG to *Ascaris lumbricoides*. The presence of the antibodies in newborn infants cannot be held as proof of *Ascaris lumbricoides* invasion.

Indeterminate results might indicate the invasion of *Ascaris lumbricoides* in anamnesis.

A negative result in the «Vitrotest Anti-Ascaris» test-kit indicates either the absence of antibodies to *Ascaris lumbricoides* in the sample tested, or that the concentration of specific antibodies is below the detection threshold of the test.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis, in fact, should take into consideration as well as clinical history, symptomatology and serological data. It is impossible to completely eliminate cross-reactions of antibodies and antigens of other worms.

13. TROUBLESHOOTING

Possible causes	Solutions
<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 $\geq 10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.
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

13. REFERENCE

1. Gildner TE, Cepon-Robins TJ, et. al. Regional variation in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections by age cohort and sex: effects of market integration among the indigenous Shuar of Amazonian Ecuador. // *J Physiol Anthropol.* – 2016. – V.35, N. 1. – P. 28.
2. Guadalupe I., Mitre E., Benitez S. et.al. Evidence for in utero sensitization to *Ascaris lumbricoides* in newborns of mothers with ascariasis. // *J Infect Dis.* - 2009. – V. 199 N.12 – p.1846–1850.
3. Khuroo M.S., Rather A.A., Khuroo N.S., Khuroo M.S. Hepatobiliary and pancreatic ascariasis// *World J. Gastroenterol.* -2016.- V 22, N 33.- P. 7507-7517.

SYMBOLS

	Catalogue number
	Consult instructions for use
	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Caution, consult accompanying documents
	Contains sufficient for <n> tests
	Temperature limitation
	Batch code
	Use by
	Date of manufacture
	Keep away from direct sun light / Не допускать воз-действия солнечного света
	Authorized representative in the European Community / Уполномоченный представитель в ЕС
	Mark of conformity to the technical regulations / Знак соответствия техническим регламентам

TY Y 24.4-36555928-001:2011
Inst_Anti-Ascaris_TK058_V01

Edition 1st, 12.09.2019.

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



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
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



ASSAY PROCEDURE



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



Dispense 90µl of [SAMPLE DILUENT] into the wells
(brown-green colour)



Dispense 10µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL +],
B1, C1, D1 – [CONTROL -],
E1 and other wells – patient samples
(colour changes from brown-green 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 at 37°C



Add 100µl of [STOP SOLUTION]
(colour changes from blue to yellow)



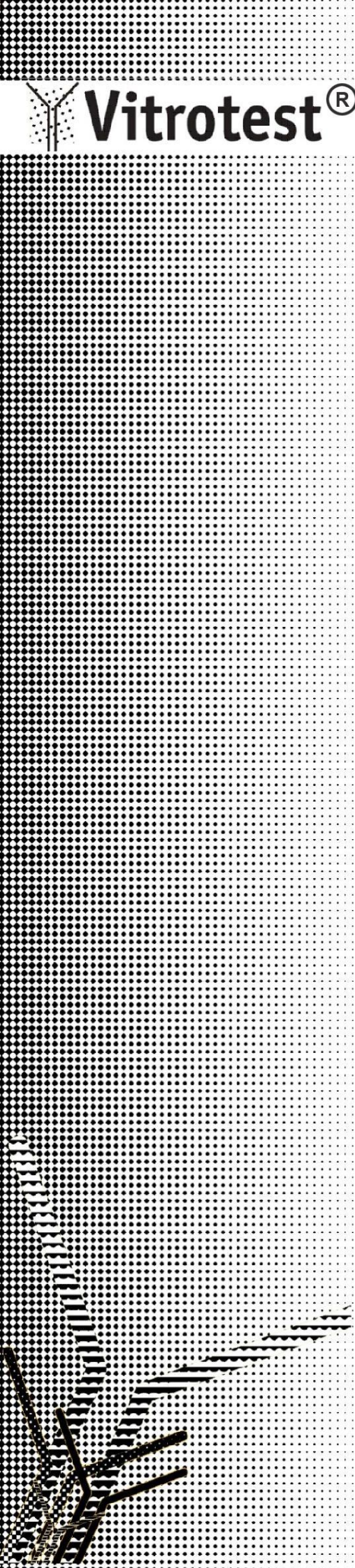
Determine the optical density (OD) at 450/620-695nm

CALCULATION

$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3$;
 $CO = Nc + 0.3$;
 $IP_{sample} = OD_{sample} / CO$;
 $Nc - OD_{mean}$ for 3 [CONTROL -]
CO - Cut off, IP- Index of Positivity

INTERPRETATION

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



Vitrotest®

Vitrotest Anti-Echinococcus

Імуноферментна тест-система для виявлення
антитіл до *Echinococcus granulosus*

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK066

«Vitrotest Anti-Echinococcus»

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до *Echinococcus granulosus*

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Anti-Echinococcus» призначена для виявлення антитіл класів IgG та IgA до *Echinococcus granulosus* у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

Ехінокоз - хронічне захворювання людини та тварин, що викликається паразитуванням личинок ґельмінта ехінокока. Збудником цього ґельмінтозу частіше за все є личинка *Echinococcus granulosus*. Ехінокоз досить розповсюджений у всьому світі, особливо у південних країнах, там, де поширене тваринництво, головним чином вівчарство.

Яйця ехінокока потрапляють в організм людини через брудні руки внаслідок контакту з собаками (рідше – котами). Також не виключене зараження при вживанні немитих овочів, ягід, фруктів, води, що забруднені яйцями ґельмінтів.

У травному каналі проміжного хазяїна яйце ехінокока звільняється від оболонки, і зародок (онкосфера) заглиблюється в слизову оболонку тонкої кишки, проникаючи через лімфатичні і венозні судини в систему ворітної вени. В результаті цього онкосфери потрапляють до внутрішніх органів, де вони, в більшості випадків, затримуються і розвиваються в ехінококові кісти. Найчастіше ехінококом уражаються печінка (в 44-85% випадків), легені (10% випадків), значно рідше нирки, селезінка, головний мозок, м'язи тощо.

Патологічний вплив ехінокока зумовлений сенсibiлізацією організму продуктами обміну паразита та механічним ушкодженням уражених органів та тканин. Розміри кіст – від 1-5 см в діаметрі до великих міхурів, що можуть містити по кілька літрів рідини. Механічний вплив такої кісти призводить до порушення функції ураженого органу, його гіпертрофії. В той же час сенсibiлізація організму продуктами обміну паразита призводить до формування гіперчутливості негайного та сповільненого типу. Ехінокоз нерідко призводить до інвалідності, а в тяжких випадках – до смерті.

Для діагностики ехінокозу використовують методи візуалізації кіст: рентгенологічні та ультразвукові дослідження, комп'ютерну та магнітно-резонансну томографію. Пункційна біопсія кісти вважається небезпечною через можливість поширення паразитів в суміжні тканини.

З огляду на те, що ехінокоз супроводжується формуванням гуморальної імунної відповіді, суттєвого значення набуває серологічна діагностика, яка має проводитись до застосовування інвазивних процедур. Виявлення в крові антитіл специфічних до антигенів ехінокока – достовірний показник інвазії паразитом. Рівень імунної відповіді значною мірою залежить від органної локалізації кісти та її морфології. Зокрема, кісти, локалізовані в печінці, частіше індукують імунну відповідь, аніж кісти в легенях, мозку та селезінці, у деяких носіїв кіст з ехінококом антитіла не утворюються. Низький вміст антитіл спостерігається на початку утворення кіст або на пізній неоперабельній стадії захворювання.

На сьогодні для виявлення антитіл специфічних до *Echinococcus granulosus* застосовують методи непрямой гемаглютинації та флуоресценції, імуноферментного аналізу. Ці методи характеризуються чутливістю в 60-90%, тож кращої інформативності досягають застосовуючи комбінацію серологічних методів.

Досить інформативними є серологічні методи і для моніторингу післяопераційного стану пацієнта – поступове зниження рівня специфічних антитіл через 4-6 місяців після хірургічного видалення кісти свідчить про успішний результат хірургічного втручання. При рецидивах утворення кіст специфічні антитіла утримуються на високому рівні роками.

3. Принцип аналізу

Виявлення антитіл до *Echinococcus granulosus* в тест-системі «Vitrotest Anti-Echinococcus» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках антигенами *Echinococcus granulosus*. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до *Echinococcus granulosus* антитіл з антигеном на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат антивидових (специфічних IgG та IgA) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імуниними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імуних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імуні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими антигенами *Echinococcus granulosus*.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів людини, специфічних до *Echinococcus granulosus* (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

Розчин для розведення сироваток РРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (коричнево-зелений).

Розчин кон'югату РК – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину, що містить суміш пероксидазних кон'югатів моноклональних антитіл до IgG та IgA людини із стабілізаторами та консервантом (зелений). Готовий до використання.

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Розчин для промивання Tw20 (20x) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Твіном-20 (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Клейка плівка – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напіваавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2}Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.

5. Застереження та техніка безпеки

5.1.Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення терміну придатності;
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

- Примітка: Допускається використання Розчину для промивання Tw20 (20x), Розчину ТМБ та Стоп-реагенту інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реагенти використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

- після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;
- чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;
- під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;
- розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;
- ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2.Техніка безпеки:

- всі реагенти набору призначені лише для in vitro діагностики;
- постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- у контролях тест-системи «Vitrotest Anti-Echinococcus» не містять HBsAg та антитіл до ВІЛ ½, ВГС, *Treponema pallidum*, однак, працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, чи іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклавайте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти (наприклад, сироваток), обробити поверхню 6%-м розчином перекису водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, за умови їх зберігання при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Anti-Echinococcus» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. В лунки стрипів внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

– видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;

– наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;

– аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;

– повторити процедуру промивання ще чотири рази;

– після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.13. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 0,8 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати, додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,3, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,3.$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ досліджуваного зразка}{Граничне значення}.$$

10.3. Інтерпретація результатів

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище 1,1** вважати **позитивними** ($ІП > 1,1$).

Зразки із значенням ІП **нижче 0,9** вважати **негативними** ($ІП < 0,9$).

Зразки із значенням ІП **в межах 0,9-1,1** вважати **невизначеними** ($0,9 \leq ІП \leq 1,1$). Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених, слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. У разі одержання невизначених результатів вважати, що сироватка не містить специфічних до *Echinococcus granulosus* антитіл.

11. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Anti-Echinococcus» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgG та/або IgA, специфічних до *Echinococcus granulosus*. Наявність антитіл цього класу у новонароджених не є доказом інвазії *Echinococcus granulosus*.

Негативний результат у тест-системі «Vitrotest Anti-Echinococcus» свідчить про відсутність у сироватці крові обстежуваної людини антитіл, специфічних до *Echinococcus granulosus*, або концентрація специфічних антитіл нижче межі чутливості аналізу. Тобто, негативний результат тесту не виключає ехінококоз у пацієнта.

Остаточний діагноз не може бути встановлений лише на підставі результатів серологічного тесту. При встановленні діагнозу слід враховувати результати комплексу лабораторних та інструментальних досліджень, а також клінічні прояви захворювання. Не можна повністю виключити перехресні реакції з антитілами до антигенів інших гельмінтів. Крім того, з обережністю слід інтерпретувати результати досліджень у пацієнтів з онкологічними захворюваннями та розладами імунної системи.

Після успішного хірургічного видалення кісти рівень специфічних антитіл починає знижуватись через 4-6 місяців.

Література

1. Гельминтозы человека // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К.Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 942-986.
2. Руководство по инфекционным болезням с атласом инфекционной патологии. Под редакцией Ю.В. Лобзина, С.С. Козлова, А.Н. Ускова. – СПб, 2000.
3. Florea A., Liviu V., Cozma V. et.al. Serological diagnosis of cystic echinococcosis by the ELISA technique, in the cases hospitalized in the Surgical Clinic no. III and Internal Medicine no. III of Cluj-Napoca, during October 2006 – December 2009. // Sci. Parasitol. – 2011. - 12(3) – p. 167-171.
4. Lightowlers M.W., Gottstein B. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. // *Echinococcus* and hydatid disease. Thompson RCA, Lymbery AJ. - Wallingford, UK: CAB International. - 1995. - p. 355-410.
5. Nour N.B., Nuñez S., Gianinazzi C., et. al. Assessment of Echinococcus granulosus Somatic Protoscolex Antigens for Serological Follow-Up of Young Patients Surgically Treated for Cystic Echinococcosis. / J. Clin. Microbiol. – 2008 - Vol. 46, No. 5. - p. 1631–1640.
6. Riganò R., Loppolo S., Ortona E., et. al. Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. / Clin. Exp. Immunol. – 2002. – 129 – p. 485–492.
7. Wenbao Z., Jun Li, Renyong Lin, et. al. Recent Advances in the Immunology and Serological Diagnosis of Echinococcosis. // Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases. Edited by Moslih Al-Moslih. - InTech Janeza, Croatia. – 2012.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest Anti-Echinococcus»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *Tw20* очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль,

B1, C1, D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричневого на синій

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest Anti-Echinococcus» за формулою:

$$ГЗ = ОГ_{K-середнє} + 0,3$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:

$$ІП = \frac{ОГ_{досліджуваного\ зразка}}{граничне\ значення}$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення ІП	Результат
$ІП_{зразка} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{зразка} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{зразка} < 0,9$	негативний