

E.A.R.-CERTIFICATE

(ART 10.3 of the Directive 98/79/EC on In Vitro Diagnostic)

REF. NO. : RP 2901-2021

ORDER NO. : DK 2491-2021

DATE: 11/01/2022

MANUFACTURER:

EKVITESTLAB LLC
Velyka Vasytkivska street, 114
03150, Kyiv, Ukraine

FACILITIES:

EKVITESTLAB LLC
Peremohy Avenue, 60/2
03057, Kyiv, Ukraine

**PRODUCT
CATEGORIES:**

Please See Annex A - List of Devices (13 Devices, 2 Pages)

MODELS:

Please See Annex A - List of Devices (13 Devices, 2 Pages)

The European Authorized Representative Center Obelis s.a. declares that the aforementioned manufacturer has fulfilled the essential requirement of appointing a European Authorized Representative in accordance with article 10.3 of the Directive 98/79/EC and to the terms and conditions set out in the agreement entered into force on 1st May 2021.*



G. ELKAYAM
C.E.O.

Obelis s.a. - O.E.A.R.C.

Registered Address :
Bld Général Wahis 53
1030 Bruxelles
Tél. +32 2 732 59 54 - Fax +32 2 732 60 03

Mr. G. Elkayam CEO

Obelis sa



Obelis European Authorized Representative Center is a member of the European Association of Authorized Representatives (E.A.A.R.), ISO 9001 : 2015 and ISO 13485 : 2016 certified in accordance to the profession of a European Authorized Representative.

* This is not a CE mark and is only provided as a template for informational purposes.

*This certificate is not a confirmation of product notification nor an approval to place products on the market.
**This certificate will become void automatically upon termination of the EAR agreement.



ANNEX to IVDD EAR Certificate

Order No.: DK 2491-2021

Reference No.: RP 2901-2021

Manufacturer: Ekvitestlab LLC

Country: Ukraine

#	EMDN	Generic device name (including BASIC UDI)	Commercial Name of device	Intended use	Class
1	52133	EQUI Ascaris lumbricoides IgG	EI-601	ELISA kit for the qualitative detection of IgG antibodies to Ascaris lumbricoides	Class I (Others)
2	63005	EQUI Opisthorchis felineus IgG	EI-602	ELISA kit for the qualitative detection of IgG antibodies to Opisthorchis felineus	Class I (Others)
3	52418	EQUI Toxocara canis IgG	EI-603	ELISA kit for the qualitative detection of IgG antibodies to Toxocara canis	Class I (Others)
4	52464	EQUI anti-Trichinella spiralis	EI-605	ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to Trichinella spiralis	Class I (Others)
5	52464	EQUI anti-Trichinella spiralis	EI-605	ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to Trichinella spiralis	Class I (Others)
6	62915	EQUI anti-Lamblia	EI-606	ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to Giardia lamblia (intestinalis)	Class I (Others)
7	48281	EQUI HAV IgM	EI-031	ELISA kit for the qualitative detection of IgM antibodies to hepatitis A virus	Class I (Others)
8	51021	EQUI anti-Helicobacter	EI-501	ELISA kit for the qualitative detection of total antibodies to Helicobacter pylori	Class I (Others)
9	51008	EQUI Helicobacter IgG	EI-502	ELISA kit for the qualitative and semiquantitative detection of IgG antibodies to CagA protein of Helicobacter pylori	Class I (Others)
10	51012	EQUI Helicobacter	EI-504	ELISA kit for the qualitative detection of IgM	Class I (Others)

		IgM		antibodies to CagA protein of <i>Helicobacter pylori</i>	
11	64800	EQUI SARS-CoV-2 IgM swift	EI-165	ELISA kit for the qualitative detection of IgM antibodies to nucleoprotein and spike antigens of SARS-CoV-2 virus	Class I (Others)
12	64830	EQUI SARS-CoV-2 IgA swift	EI-166	ELISA kit for the qualitative detection of IgA antibodies to nucleoprotein and spike antigens of SARS-CoV-2 virus	Class I (Others)
13	64824	EQUI SARS-CoV-2 IgG swift	EI-167	ELISA kit for the qualitative detection of IgG antibodies to nucleoprotein and spike antigens of SARS-CoV-2 virus	Class I (Others)

Date: 11 January 2022

CEO Of Obelis

Gideon Elkayam

d (Jan 14, 2022 12:31 GMT+3)

G. ELKAYAM
C.E.O.
Obelis s.a. - O.E.A.R.C.
Registered Address :
Bld Général Wahis 53
1030 Bruxelles
Tél. +32 2 732 59 54 - Fax +32 2 732 60 03

CERTIFICATE

MANAGEMENT SYSTEM CERTIFICATION BODY
«CONFORMITY ASSESSMENT BODY «PROMSTANDART», LLC
certifies that the enterprise

EKVITESTLAB
Limited Liability Company

registration code 38745936

legal address:

Ukraine, 03150, Kyiv, 114 Velyka Vasylkivska street,

manufacturer's address:

Ukraine, 04212, Kyiv, 60/2 Peremohy Avenue



has established and applies quality management system for
development, production, storage and sale
of ELISA kits for in vitro diagnostic

Audit, № report 2020/015-20.2.1
confirmed that the requirements

ISO 13485:2016

**«Medical devices — Quality management systems —
Requirements for regulatory purposes»**

are performed.

The control of conformity of the certified quality management system to the requirements of the specified standard is carried out by means of supervisory audit, the periodicity and procedures of which are regulated by the program.

Certificate registration number № UA.QMS.00014-21
Registered 06 April 2021
Valid until 05 April 2024



80156
DSTU EN ISO/IEC 17021-1

Director of Certification Body
«CAB «PROMSTANDART», LLC



Sergiy Dubrovskiy

210107

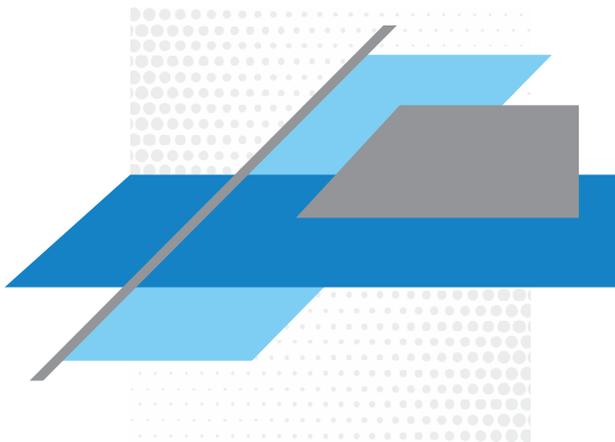
The validity of certificate can be verified by telephone: (056) 742-82-39
or on website of «CAB «PROMSTANDART», LLC: prom-standart.com.ua



anti-HCV

ИФА-набор для качественного определения суммарных антител к вирусу гепатита С

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-021

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI anti-HCV

ИФА-набор для качественного определения суммарных антител к вирусу гепатита С

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI anti-HCV» предназначен для качественного определения суммарных антител к вирусу гепатита С (ВГС) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики гепатита С и скрининга донорской крови. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гепатит С – это вирусное поражение печени. Вирус гепатита С (ВГС) вызывает острую инфекцию, которая может перейти в хроническую форму. Вирус гепатита С относится к семейству *Flaviviridae*. Вирионы маленькие (50-60 nm), сферические, покрытые оболочкой. Генетический материал вируса представлен одноцепочечной РНК. Передача вируса происходит гемотрансмиссивным путем, для заражения здорового организма достаточно небольшого количества крови, содержащей ВГС. Инкубационный период гепатита С может длиться от двух недель до полугода.

В связи с бессимптомным течением гепатит С редко выявляют на ранних стадиях. По рекомендациям международных организаций в сфере здравоохранения (ВОЗ, CDC) диагностика инфекции ВГС проводится в два этапа. Сначала проводится серологический скрининг на антитела к вирусу гепатита С. Затем для положительных образцов необходимо подтвердить наличие хронической гепатитной инфекции обнаружением РНК вируса. Антитела к ВГС при отсутствии генетического материала вируса не могут свидетельствовать об активной инфекции у пациента. После диагностирования гепатитной инфекции оценивают степень поражения печени (фиброза, цирроза), проводят дополнительные лабораторные тесты для назначения лечения и мониторинга его эффективности.

«Серологическое окно» и характер иммунного ответа после инфицирования могут сильно отличаться у разных пациентов. Первыми в крови инфицированных оказываются РНК и Core-антиген вируса (через 1-3 недели). ВГС-специфические антитела IgM класса обнаруживаются через 1-2 месяца после инфицирования. У 50-90% пациентов с острой гепатитной

инфекцией они могут определяться в высоких титрах несколько месяцев. Впоследствии, у 50-70% лиц, больных хроническим гепатитом С, IgM антитела обнаруживаются на невысоких уровнях, особенно при обострении инфекционного процесса. После эффективной терапии ВГС-специфические IgM антитела исчезают через несколько месяцев. Этот маркер важен для мониторинга лечения, но не является информативным для скрининга гепатита С. Продуцирование антител ВГС на относительно низком уровне во время острой фазы начинается почти одновременно с антителами класса IgM, но постепенно возрастает при хронизации инфекции. IgG антитела к ВГС производятся на высоких уровнях во время хронического гепатита С и могут проявляться даже после выведения вируса из организма.

При производстве иммуноферментных тестов третьего поколения для диагностики гепатита С используются рекомбинантные антигены ВГС, аналоги белков Core, NS3, NS4 и NS5. Чувствительность таких тестов достигает 99%, а специфичность приближается к 100%. Однако, чувствительность и специфичность ИФА тестов разных производителей могут несколько отличаться. Ложноотрицательные анализы встречаются у иммуносупрессированных лиц, а ложноположительные результаты могут быть связаны со способом получения рекомбинантных белков. Результаты обнаружения антител к ВГС необходимо подтверждать другими лабораторными методами.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител, специфичных к ВГС, в ИФА-наборе «EQUI anti-HCV» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены вируса гепатита С: core, NS3, NS4 та NS5. При первом этапе инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфические к ВГС антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с соответствующими антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется смесь конъюгатов антивидовых (анти-IgG и анти-IgM) моноклональные антитела с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620–695 нм. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

STRIPS 1 x 96 лунок
В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены ВГС: core, NS3, NS4 та NS5. Лунки можно отделять. После первого вскрытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев

CONTROL + 1 x 0,6 ml
Позитивный контроль
Раствор иммуноглобулинов человека, специфичных к ВГС, с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

CONTROL - 1 x 1,6 ml
Негативный контроль
Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

DIL|SAMPLE 1 x 11 ml
Раствор для разведения сывороток
Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C

SOLN|CONJ 1 x 13 ml
Раствор конъюгата (готов к использованию)
Буферный раствор моноклональных антител к IgG и IgM человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый). Хранить при температуре 2-8°C

SOLN|TMB 1 x 13 ml
Раствор ТМБ (готов к использованию)
Раствор ТМБ, H₂O₂, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

TRITON|WASH|20x 1 x 50 ml
Раствор для промывки TRITON (20x концентрат)
20-кратный концентрат фосфатного буфера с Тритоном X-100 (бесцветный). Развести раствор для промывки TRITON (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток

SOLN|STOP 1 x 13 ml
Стоп-раствор (готов к использованию)
Раствор 0,5 mol H₂SO₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры

для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора по истечении срока годности;
- не используйте при анализе и не смешивайте компоненты различных серий, компоненты из наборов различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI anti-HCV»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывки контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- **SOLN|TMB** должно быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта **SOLN|TMB** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для **SOLN|CONJ** и **SOLN|TMB**;
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и требует очистки и обеззараживания;
- ИФА набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для профессионального лабораторного применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;

- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- [CONTROL+] ИФА-набора «EQUI anti-HCV» содержит иммуноглобулины человека, специфические к ВГС, которые были выделены с инаktivированным прогреванием сывороток крови человека, в которых не было обнаружено HBsAg и антител к ВПЛ1/2 и *Treponema pallidum*, однако работать с контролем следует как с потенциально инфекционным материалом;
- [CONTROL-] ИФА-набора «EQUI anti-HCV» протестировано и признано отрицательным на HBsAg и антитела к ВПЛ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и изучаемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ] на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, затем вытереть досуха фильтровальной бумагой. В противном случае кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инаktivация и утилизация отходов

- жидкие отходы следует инаktivировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инаktivировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не менее 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инаktivированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

ИФА набор стабильный в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо собирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и дать забор образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму можно хранить при температуре 2-8°C в пределах 3 суток. Допускается более длительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Перед использованием замороженные образцы следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторной заморозки-оттаивания исследуемых образцов. При помутнении сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, закрыть плотно и положить в центре термоконтнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стен термоконтнера и покрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты набора ИФА при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предотвращения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение таким образом упакованного планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешайте. Например, 5 мл концентрата + 95 мл воды, что достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате промывочного раствора прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контроля и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl [DIL|SAMPLE].
- 9.5. Внесите в лунки по 40 µl контролей и исследуемых образцов:
[CONTROL|+] – в лунку A1,
[CONTROL|-] – в лунки B1, C1, D1,
в остальные лунки – исследуемые образцы.
- При внесении происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.
- 9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывки, оставьте не менее 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должно составлять не более 5 µl;
 - повторите процедуру промывки еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, соблюдая ту же последовательность, что и при внесении [SOLN|TMB]. При внесении происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором несколько меняется оттенок.
- 9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения

измерения убедитесь в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установки бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитайте среднее значение ОП негативного контроля (\bar{Nc}) и уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,25$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

$$[CONTROL +] \quad ОП \geq 1,5$$

$$[CONTROL -] \quad ОП \leq 0,100$$

$$[CONTROL -] \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{где } Ncn - ОП \text{ каждого повтора } Nc$$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают \bar{Nc} по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не соответствует указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного выполнения.

10.3. Интерпретация результатов

$$\begin{array}{lll} OD_{sample} \geq CO & \text{ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ*} & , \text{ где } OD_{sample} - \\ OD_{sample} < CO & \text{ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ} & \text{ОП образца} \end{array}$$

* Первоначально положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора ИФА «EQUI anti-HCV». После повторного тестирования положительными считаются образцы, оптическая плотность которых хотя бы в одном из повторов превышает предельное значение. Согласно рекомендациям ВОЗ, для диагностики гепатита С образцы, интерпретированные как положительные, должны быть дополнительно проверены на наличие РНК вируса гепатита С. Положительный результат на анти-ВГС антитела при отсутствии РНК вируса не может свидетельствовать об активной гепатитной инфекции. Если при повторном тестировании оптическая плотность образца в обоих повторах ниже граничного значения, такой образец считать отрицательным.

Результаты для образцов, ОП которых равно граничному значению или находится в пределах $\pm 10\%$, следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI Редакция 7 от 11.10.2021г.

anti-HCV». Если при повторном тестировании OD_{sample} снова находится в пределах $\pm 10\%$ от граничного значения следует провести отбор и анализ нового образца.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	CV, %
973/300	1,422	6,9
704/500	1,845	5,0

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	CV, %
973/300	1,500	8,6
704/500	1,912	8,5

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,1 mg/ml (172,3 $\mu\text{mol/l}$), гемоглобина в концентрации до 5 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности и специфичности ИФА-наборов «EQUI anti-HCV» использовали 67 образцов сывороток от пациентов с диагнозом ВГС и 300 образцов сывороток клинически здоровых доноров. Кроме того, были использованы коммерческие панели охарактеризованных образцов производства SeraCare Life Sciences Inc., а также стандартная панель «Стандарт АТ(+/-)ВГС-МБА» производства ООО «Медбиоальянс». Клиническая чувствительность ИФА-наборов «EQUI anti-HCV» составила 100%, клиническая специфичность – 99,7%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичным коммерческим ИФА-набором проводилось на целевой группе беременных женщин (169 образцов). Для этой выборки относительная специфичность набора «EQUI anti-HCV» составляла 100%, процент совпадения - 98,2%.

Положительная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI anti-HCV» составляет 99,1%, отрицательная прогностическая ценность (NPV) – 100%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Интерпретация результатов должна проводиться с учетом клинических проявлений и данных комплекса лабораторных исследований. Для диагностики острого, хронического или перенесенного гепатита С, оценки эффективности терапии рекомендуется дополнительно провести исследование образца на наличие РНК ВГС, антител к отдельным белкам ВГС и анти-ВГС IgM антител (например, в ИФА-наборах «EQUI anti-HCV Different» и «EQUI HCV IgM», соответственно), и оценить биохимические показатели сыворотки крови.

Современные методы выявления антител к ВГС не могут обеспечить выявления всех инфицированных пациентов. Негативный результат не исключает инфицирование вирусом гепатита С пациента, особенно если он проходит иммуносупрессивное лечение или инфицированный ВИЧ, а также на ранних стадиях гепатитной инфекции.

Любой из методов ИФА может допустить ложноположительную реакцию. Для исключения ложноположительных результатов рекомендуется провести верификационное исследование с определением РНК вируса гепатита С или антител к отдельным ВГС белкам.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brillanti S., Masci C., Miglioli M. and Barbara L. Serum IgM antibodies to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. // Archives of virology. Supplementum. - 1993. – N8. – P.213-218.
2. Casino C., Lilli D., Rivanera D., et. al. Diagnostic value of anti-hepatitis C virus (HCV) core immunoglobulin M in recurrence of HCV infection after orthotropic liver transplantation. // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. – Vol.37, N.8. – P.2726-2728.
3. CDC Testing Recommendations for Hepatitis C Virus Infection, 2015 // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/guidelinesc.htm>.
4. Dal Molin G., Tiribelli C. Campello C. A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Annals of hepatology. - 2003. – Vol.2. – P.76-83.
5. Gupta E., Bajpai M. and Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays // Asian Journal of Transfusion Science. - 2014. - Vol.8. - P.19-25.
6. Lefrere J.J., Guiramand S., et al. Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus // Journal of Infectious Diseases. - 1997. - Vol.175. - P.316–322.
7. Richter S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Journal of Clinical Microbiology. - 2002. – Vol.40. – N.12. – P.4407-4412.
8. Urdea M.S., Wuestehube L.J., Laurenson P.M., and Wilber J.C. Hepatitis C – diagnosis and monitoring. // Clinical Chemistry. - 1997. – V.43. – N.8. – P.1507-1511.
9. WHO Global Hepatitis Report, 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/globalhepatitis-report2017/en/>
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.

	Производитель
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер по каталогу
	Дата изготовления
	Использовать до
	Код партии
	Температурное ограничение
	Содержит достаточно для (n-) испытаний
	Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами
	Ознакомление с инструкцией по применению
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 11.10.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»
ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25 °C

В лунки планшета внести по 80 µl [DIL|SAMPLE]
(коричневый цвет)

Внести по 40 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **60 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|CONJ]
(зеленый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать в течение **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = Nc + 0,25;$$

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL|-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

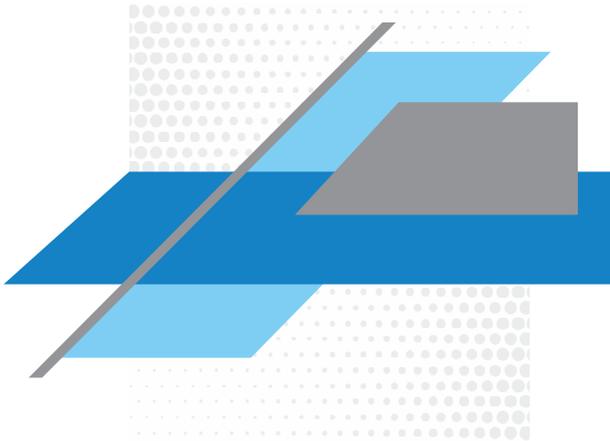
$OD_{sample} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{sample} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Chlamydia trachomatis IgA

ИФА-набор для качественного и полуколичественного
обнаружения антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis*

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-103

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI Chlamydia trachomatis IgA

ИФА-набор для качественного и полуколичественного обнаружения антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» предназначен для качественного и полуколичественного обнаружения антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики урогенитального хламидиоза. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: женщины и мужчины репродуктивного возраста, бесплодные пары, пациенты с заболеваниями мочеполовой системы.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях и других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Среди бактериальных заболеваний, передающихся половым путем, наиболее распространенным в мире называют урогенитальный хламидиоз. Этиологическим агентом урогенитального хламидиоза являются *Chlamydia trachomatis* – мелкие (250-300 nm) грамотрицательные коковидные бактерии, паразитирующие внутри клеток. Особенностью хламидий является их жизненный цикл, заключающийся в поочередном изменении неинфекционных внутриклеточных форм (больших ретикулярных телец) и инфекционных внеклеточных (мелких элементарных телец).

Из-за особенностей жизненного цикла *Chlamydia trachomatis* для лабораторной диагностики хламидиоза чаще всего используют метод ПЦР (для прямого обнаружения возбудителя) и серологический метод (особенно ИФА для выявления специфических антител к хламидиям). Другие методы имеют более низкую информативность (например, чувствительность микроскопического анализа мазка/соскреба и реакции иммунофлюоресценции оценивают в 15–50%) или большую трудоемкость (как культуральный метод, дополнительно позволяет определить чувствительность бактерий к антибиотикам). Наиболее чувствительный и специфический (до 100%) при обнаружении инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*, метод ПЦР, но его результат зависит от способа забора и хранения материала для анализа. Благодаря выявлению специфических иммуноглобулинов IgM, IgA и IgG можно дифференцировать первичный, острый, хронический и перенесенный хламидиоз. Однако следует иметь в виду, что некоторые методы не могут исключать перекрестные реакции с антителами к другим видам хламидий, способным инфицировать человека (*Chlamydia psittaci* и *Chlamydia pneumoniae*).

На первой-второй неделе после инфицирования начинают синтезироваться и выявляться IgM и IgA антитела к антигенам хламидий в крови или секретах организма. Они свидетельствуют об остром заболевании при первичной инфекции, а IgA также обнаруживаются при реинфекции или реактивации хламидиоза. Еще через неделю начинают проявляться антитела IgG, специфичные к *Chlamydia trachomatis*; высокие титры этих антител могут являться признаком хронической хламидийной инфекции. Снижение уровня специфических IgA в два-три раза считается свидетельством эффективной терапии. Антитела к хламидийному hsp60 могут являться признаком наличия длительной инфекции и развития аутоиммунных процессов. Специфические к *Chlamydia trachomatis* иммуноглобулины IgG даже после лечения сохраняются в крови и могут проявляться в невысоких титрах годами, поэтому их нельзя рассматривать как показания хламидийной инфекции без оценки других маркеров. Вместе с тем наличие специфических антител не обеспечивает защиты против повторного инфицирования *Chlamydia trachomatis*.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgA, специфичных к *Chlamydia trachomatis*, в ИФА-наборе «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» основано на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены *Chlamydia trachomatis*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфичны к *Chlamydia trachomatis* антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgA моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS

1 x 96
лунок

Планшет ИФА

В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены *Chlamydia trachomatis*. Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев

CONTROL IgA +	1 x 0,8 ml	Позитивный контроль IgA Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
CONTROL -	1 x 1,9 ml	Негативный контроль Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
DIL SAMPLE	1 x 11 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN CONJ IgA	1 x 13 ml	Раствор конъюгата анти-IgA (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgA человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (оранжевый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
TRITON WASH 20x	1 x 50 ml	Раствор для промывки TRITON (20x концентрат) 20-кратный концентрат фосфатного буфера с Тритоном X-100 (бесцветный). Развести раствор для промывки TRITON (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток
SOLN STOP	1 x 13 ml	Стоп-раствор (готов к использованию) Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термошейкер на 37°C или термостат на 42°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI Chlamydia trachomatis IgA»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- **SOLN|TMB** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта **SOLN|TMB** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- и в коем случае не используйте одну и ту же посуду для **SOLN|CONJ|IgA** и **SOLN|TMB**;
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;
- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;

- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» протестированы и признаны негативными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролями и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ|IgA] на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, затем вытереть досуха фильтровальной бумагой. В противном случае кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной

температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термokonтейнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термokonтейнера и накрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите **TRITON|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl **DIL|SAMPLE**.
- 9.5. Внесите в лунки по 40 µl контролей и исследуемых образцов:

CONTROL|IgA|+ – в лунку A1,

CONTROL|- – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

При внесении происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.

9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

– удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;

– наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;

– аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;

– повторите процедуру промывания еще пять раз;

– после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

9.8. Внесите в лунки по 100 µl **SOLN|CONJ|IgA**. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при 37°C.

9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.

9.10. Внесите в лунки по 100 µl **SOLN|TMB**, не касаясь дна и стенок лунок планшета.

9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.

9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl **SOLN|STOP** для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **SOLN|TMB**. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.

9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

*Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только **SOLN|TMB** и **SOLN|STOP**).*

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП негативного контроля (\bar{Nc}), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,25$$

$$IP_{sample} = OD_{sample}/CO, \text{ где } OD_{sample} - \text{ОП образца}$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

$$\boxed{\text{CONTROL}} | \boxed{\text{lgA}} | + \quad \text{ОП} \geq 1,5$$

$$\boxed{\text{CONTROL}} | - \quad \text{ОП} \leq 0,150$$

$$\boxed{\text{CONTROL}} | - \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{где } Ncn - \text{ОП каждого повтора } Nc$$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают \bar{Nc} по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

10.3. Интерпретация результатов

$$\begin{array}{ll} IP_{sample} > 1,1 & \text{ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ} \\ 0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1 & \text{НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*} \\ IP_{sample} < 0,9 & \text{ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ} \end{array}$$

* Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно в двух лунках набора ИФА. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует провести отбор и анализ нового образца через 2-4 недели. В случае повторного получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели. При этом следует учитывать, что IP_{sample} в пределах 1,1 – 7,0 пропорционален содержанию специфических антител. Если IP_{sample} составляет выше 7,0, для корректной оценки содержания специфических антител рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разбавленного в 10 раз $\boxed{\text{DIL}} | \boxed{\text{SAMPLE}} |$. При определении конечного результата в таком случае следует умножить полученное значение IP_{sample} на степень разведения ($\times 10$).

Интерпретация результатов обнаружения антител к *Chlamydia trachomatis*

Наличие специфических антител к <i>Chlamydia trachomatis</i>			Интерпретация результата
IgG	IgA	IgM	
Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Образец не содержит специфических антител или их концентрация ниже предела чувствительности анализа
Отсутствуют	Определяются	Определяются	Вероятна ранняя стадия инфекции
Определяются	Отсутствуют	Отсутствуют	Вероятная перенесенная инфекция
Определяются	Определяются	Определяются	Острая инфекция
Определяются	Определяются	Отсутствуют	Острая или хроническая инфекция

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител и разным индексом позитивности оценивали в 16 повторах одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
283	0,848	2,7	4,4
262	1,380	4,5	4,8

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
283	0,854	2,8	5,4
262	1,416	4,6	5,4

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет наличие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

В результате проведенных исследований не выявлено перекрестных реакций с антителами класса IgG к *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Toxoplasma gondii*, вирусам краснухи, Эпштейну-Барр, простому герпесу 1 и 2 типа и цитомегаловируса. Также не выявлено влияния на результат анализа ревматоидного фактора в образцах до концентрации 1390 IU/мл (МЕ/мл). Результат анализа, полученный для каждого образца, сравнивали с результатом, полученным в коммерческом наборе, имеющем СЕ-

маркировку, и рассчитывали относительную специфичность ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgG».

11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности и специфичности ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» использовали 37 образцов сывороток, полученных от пациентов с клиническими симптомами, характерными для урогенитального хламидиоза, и 43 образца сывороток клинически здоровых пациентов. Также были проверены Стандартные панели сывороток, содержащие и не содержащие видоспецифические IgA к *Chlamydia trachomatis* «Стандарт АТ-А(+/-) *C. trachomatis* (ОСО 42-28-344-01)» серий 005 и 1216/1 (производства ЗАО «МБС») – по 12 положительных и 18 отрицательных сывороток в каждом наборе. Клиническая чувствительность ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» составляла 90,2%, клиническая специфичность – 98,7%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичной коммерческой тест-системой проводилось на целевой группе беременных женщин (202 образца) и выборке доноров (270 образцов). Для выборки беременных относительная специфичность ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» составляла 97,42%, а процент совпадения – 97,5%. Для выборки доноров эти показатели составили 98,4% и 97,68% соответственно. Распространенность в популяции данного серологического маркера хламидийной инфекции составила 3% для выборки беременных и 3,47% для выборки доноров, что полностью соответствует литературным данным.

Позитивная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» составляет 98,2%, негативная прогностическая ценность (NPV) – 92,9%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgA, специфичных к *Chlamydia trachomatis*, продуцируемых организмом при инфицировании возбудителем урогенитального хламидиоза.

Следует заметить, что в случае ранней хламидийной инфекции результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител на начальной стадии болезни. При наличии клинических проявлений заболевания рекомендуется провести повторное тестирование не менее чем через две недели, а также исследовать образец пациента на специфические антитела класса IgM (например, с использованием набора ИФА «EQUI Chlamydia trachomatis IgM»).

Для корректной диагностики хламидиоза также следует определить уровень специфических к *Chlamydia trachomatis* антител в парных сыворотках, полученных с интервалом забора крови не менее двух недель. Двух-трехкратное повышение уровня антител свидетельствует об активности инфекционного процесса. Кроме того, рекомендуется провести исследования по выявлению хламидий культуральным методом

Редакция 7 от 13.12.2021г. 12/16

(посев), с помощью ПЦР, РИФ или микроскопического анализа мазка/соскоба. Для постановки диагноза следует учитывать как результаты лабораторных исследований, так и клинические проявления заболевания.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Byrne G.I. Chlamydia trachomatis Strains and Virulence: Rethinking Links to Infection Prevalence and Disease Severity // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2010. - Vol.201 (2). - P. S126–S133.
2. CDC. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. - 2002. - Vol.51, No.RR-15. - 38 p.
3. Domeika K., Brade L. et al. Characterization of serum antibody response to chlamydiae in patients with sexually acquired reactive arthritis // *Pathogens and Disease*. - 1997. - Vol. 19(3). - P. 191–202.
4. Idahl A., Boman J., Kumlin U., Olofsson J.I. Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy // *Human Reproduction*. - 2004. - Vol.19 (5). - P. 1121–1126.
5. Ismail M.K. and Ali A.S. Evaluation of Chlamydia Trachomatis Antibodies In Women with Infertility // *Al-Mustansiriyah Journal of Science*. - 2012. - Vol. 23, No 3. - P. 21–28.
6. Keegan M.B., Diedrich J.T. and Peipert J.F. Chlamydia trachomatis Infection: Screening and Management // *Journal of Clinical Outcomes Management*. - 2014. - Vol.21 (1). - P. 30–38.
7. Vasilevsky S., Greub G., Nardelli-Haeffliger D. and Bauda D. Genital Chlamydia trachomatis: Understanding the Roles of Innate and Adaptive Immunity in Vaccine Research // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2014. - Vol. 27, No. 2. - P. 346–370.
8. Witkin S.S. Immunological aspects of genital chlamydia infections // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* - 2002. - Vol. 16. - P. 865–874.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002*// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 13.12.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквитестлаб»

ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки планшета внести по 80 µl [DIL|SAMPLE]
(коричневый цвет)

Внести по 40 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL|IgA+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|CONJ|IgA]
(оранжевый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать на протяжении **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{N}_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3})/3;$$

$$CO = \bar{N}_c + 0,25;$$

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

\bar{N}_c - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL|-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс позитивности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

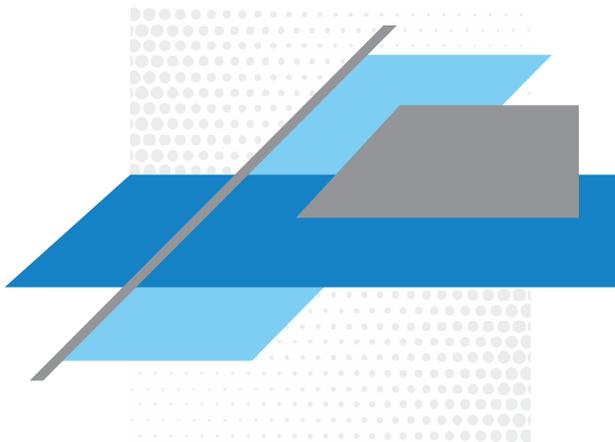
$IP_{\text{sample}} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Chlamydia trachomatis IgG

ИФА-набор для качественного и полуколичественного
обнаружения антител класса IgG к *Chlamydia trachomatis*

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-102

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI *Chlamydia trachomatis* IgG

ИФА-набор для качественного и полуколичественного обнаружения антител класса IgG к *Chlamydia trachomatis*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI *Chlamydia trachomatis* IgG» предназначен для качественного и полуколичественного обнаружения антител класса IgG к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики урогенитального хламидиоза. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: женщины и мужчины репродуктивного возраста, бесплодные пары, пациенты с заболеваниями мочеполовой системы.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях и других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Среди бактериальных заболеваний, передающихся половым путем, наиболее распространенным в мире называют урогенитальный хламидиоз. Этиологическим агентом урогенитального хламидиоза являются *Chlamydia trachomatis* – мелкие (250-300 nm) грамотрицательные коковидные бактерии, паразитирующие внутри клеток. Особенностью хламидий является их жизненный цикл, заключающийся в поочередном изменении неинфекционных внутриклеточных форм (больших ретикулярных телец) и инфекционных внеклеточных (мелких элементарных телец).

Из-за особенностей жизненного цикла *Chlamydia trachomatis* для лабораторной диагностики хламидиоза чаще всего используют метод ПЦР (для прямого обнаружения возбудителя) и серологический метод (особенно ИФА для выявления специфических антител к хламидиям). Другие методы имеют более низкую информативность (например, чувствительность микроскопического анализа мазка/соскреба и реакции иммунофлюоресценции оценивают в 15–50%) или большую трудоемкость (как культуральный метод, дополнительно позволяет определить чувствительность бактерий к антибиотикам). Наиболее чувствительный и специфический (до 100%) при обнаружении инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*, метод ПЦР, но его результат зависит от способа забора и хранения материала для анализа. Благодаря выявлению специфических иммуноглобулинов IgM, IgA и IgG можно дифференцировать первичный, острый, хронический и перенесенный хламидиоз. Однако следует иметь в виду, что некоторые методы не могут исключать перекрестные реакции с антителами к другим видам хламидий, способным инфицировать человека (*Chlamydia psittaci* и *Chlamydia pneumoniae*).

На первой-второй неделе после инфицирования начинают синтезироваться и выявляться IgM и IgA антитела к антигенам хламидий в крови или секретах организма. Они свидетельствуют об остром заболевании при первичной инфекции, а IgA также обнаруживаются при реинфекции или реактивации хламидиоза. Еще через неделю начинают проявляться антитела IgG, специфичные к *Chlamydia trachomatis*; высокие титры этих антител могут являться признаком хронической хламидийной инфекции. Снижение уровня специфических IgA в два-три раза считается свидетельством эффективной терапии. Антитела к хламидийному hsp60 могут являться признаком наличия длительной инфекции и развития аутоиммунных процессов. Специфические к *Chlamydia trachomatis* иммуноглобулины IgG даже после лечения сохраняются в крови и могут проявляться в невысоких титрах годами, поэтому их нельзя рассматривать как показания хламидийной инфекции без оценки других маркеров. Вместе с тем наличие специфических антител не обеспечивает защиты против повторного инфицирования *Chlamydia trachomatis*.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфичных к *Chlamydia trachomatis*, в ИФА-наборе «EQUI Chlamydia trachomatis IgG» основано на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены *Chlamydia trachomatis*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфичны к *Chlamydia trachomatis* антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS

1 x 96
лунок

Планшет ИФА

В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены *Chlamydia trachomatis*. Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев

CONTROL IgG+	1 x 0,8 ml	Позитивный контроль IgG Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
CONTROL -	1 x 1,9 ml	Негативный контроль Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
DIL SAMPLE	1 x 11 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN CONJ IgG	1 x 13 ml	Раствор конъюгата анти-IgG (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
TRITON WASH 20x	1 x 50 ml	Раствор для промывки TRITON (20x концентрат) 20-кратный концентрат фосфатного буфера с Тритоном X-100 (бесцветный). Развести раствор для промывки TRITON (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток
SOLN STOP	1 x 13 ml	Стоп-раствор (готов к использованию) Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термошейкер на 37°C или термостат на 42°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI Chlamydia trachomatis IgG»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- [SOLN|TMB] должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта [SOLN|TMB] с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- и в коем случае не используйте одну и ту же посуду для [SOLN|CONJ|IgG] и [SOLN|TMB];
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;
- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;

- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» протестированы и признаны негативными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролями и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ|IgG] на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, затем вытереть досуха фильтровальной бумагой. В противном случае кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной

сыворотки при температуре -20°C или -70°C . Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтнера и накрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре $18-25^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите **TRITON|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 μl **DIL|SAMPLE**.

9.5. Внесите в лунки по 40 µl контролей и исследуемых образцов:

CONTROL|IgG|+ – в лунку A1,

CONTROL|- – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

При внесении происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.

9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

– удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;

– наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;

– аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;

– повторите процедуру промывания еще пять раз;

– после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

9.8. Внесите в лунки по 100 µl **SOLN|CONJ|IgG**. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при 37°C.

9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.

9.10. Внесите в лунки по 100 µl **SOLN|TMB**, не касаясь дна и стенок лунок планшета.

9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.

9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl **SOLN|STOP** для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **SOLN|TMB**. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.

9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

*Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только **SOLN|TMB** и **SOLN|STOP**).*

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП негативного контроля (\bar{N}_c), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}).

$$\bar{N}_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3})/3; \quad CO = \bar{N}_c + 0,25$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ где } OD_{sample} - \text{ОП образца}$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL | IgG | + ОП $\geq 1,5$

CONTROL | - ОП $\leq 0,150$

CONTROL | - $\bar{N}_c \times 0,5 \leq N_{cn} \leq \bar{N}_c \times 2,0$

где N_{cn} – ОП
каждого повтора
 N_c

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают \bar{N}_c по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

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 рекомендуется исследовать повторно в двух лунках набора ИФА. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует провести отбор и анализ нового образца через 2-4 недели. В случае повторного получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели. При этом следует учитывать, что IP_{sample} в пределах 1,1 – 7,0 пропорционален содержанию специфических антител. Если IP_{sample} составляет выше 7,0, для корректной оценки содержания специфических антител рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разбавленного в 10 раз DIL | SAMPLE |. При определении конечного результата в таком случае следует умножить полученное значение IP_{sample} на степень разведения ($\times 10$).

Интерпретация результатов обнаружения антител к *Chlamydia trachomatis*

Наличие специфических антител к <i>Chlamydia trachomatis</i>			Интерпретация результата
IgG	IgA	IgM	
Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Образец не содержит специфических антител или их концентрация ниже предела чувствительности анализа
Отсутствуют	Определяются	Определяются	Вероятна ранняя стадия инфекции
Определяются	Отсутствуют	Отсутствуют	Вероятная перенесенная инфекция
Определяются	Определяются	Определяются	Острая инфекция
Определяются	Определяются	Отсутствуют	Острая или хроническая инфекция

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для троих сывороток с разным уровнем специфических антител и разным индексом позитивности оценивали в 32 повторах одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
25	0,843	3,1	2,8
662	1,885	6,9	3,1
274	2,331	8,5	3,2

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
25	0,864	3,1	5,2
662	1,840	6,7	4,8
274	2,394	8,7	4,1

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет наличие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

В результате проведенных исследований не выявлено перекрестных реакций с антителами класса IgG к *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Toxoplasma gondii*, вирусам краснухи, Эпштейну-Барр, простому герпесу 1 и 2 типа и цитомегаловируса. Также не выявлено влияния на результат анализа ревматоидного фактора в образцах до концентрации 1390 IU/мл (МЕ/мл). Результат анализа, полученный для каждого образца, сравнивали с результатом, полученным в коммерческом наборе, имеющем СЕ-

маркировку, и рассчитывали относительную специфичность ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgG».

11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности и специфичности ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgG» использовали 38 образцов сывороток, полученных от пациентов с клиническими симптомами, характерными для урогенитального хламидиоза, и 55 образцов сывороток клинически здоровых пациентов. Также были проверены Стандартные панели сывороток, содержащие и не содержащие видоспецифические IgG к *Chlamydia trachomatis* «Стандарт АТ-G(+/-) *C.trachomatis* (ОСО 42-28-313-00)» серий 006 и 1216/3 (производства ЗАО «МБС») – по 16 положительных и 20 отрицательных сывороток в каждом наборе. Клиническая чувствительность ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgG» составляла 92,9%, клиническая специфичность – 96,8%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичной коммерческой тест-системой проводилось на целевой группе беременных женщин (202 образца) и выборке доноров (270 образцов). Для выборки беременных относительная чувствительность ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgG» составляла 96,77%, относительная специфичность – 93,98%, а процент совпадения – 94,42%. Для выборки доноров относительная чувствительность наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgG» составила 94,74%, относительная специфичность – 95,74%, процент совпадения – 95,67%. Распространенность данного серологического маркера хламидийной инфекции в популяции составила 15,74% для выборки беременных и 7,48% для выборки доноров, что полностью соответствует литературным данным.

Позитивная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора EQUI Chlamydia trachomatis IgG составляет 95,6%, негативная прогностическая ценность (NPV) – 94,8%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI Chlamydia trachomatis IgG» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфических к *Chlamydia trachomatis*, которые продуцируются организмом при инфицировании возбудителем урогенитального хламидиоза.

Следует заметить, что в случае ранней хламидийной инфекции результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител на начальной стадии болезни. При наличии клинических проявлений заболевания рекомендуется провести повторное тестирование не менее чем через две недели, а также исследовать образец пациента на специфические антитела классов IgA и IgM (например, с использованием ИФА-наборов «EQUI Chlamydia trachomatis IgA» и «EQUI Chlamydia trachomatis IgM»).

Для корректной диагностики хламидиоза также следует определить уровень специфических к *Chlamydia trachomatis* антител в парных сыворотках, полученных с интервалом забора крови не менее двух недель. Двух-трехкратное повышение уровня антител свидетельствует об активности инфекционного процесса. Кроме того, рекомендуется провести исследование по выявлению хламидий культуральным методом (посев), с помощью ПЦР, РИФ или микроскопического анализа мазка/соскреба. Для постановки диагноза следует учитывать как результаты лабораторных исследований, так и клинические проявления заболевания.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Byrne G.I. Chlamydia trachomatis Strains and Virulence: Rethinking Links to Infection Prevalence and Disease Severity // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2010. - Vol.201 (2). - P. S126–S133.
2. CDC. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. - 2002. - Vol.51, No.RR-15. - 38 p.
3. Domeika K., Brade L. et al. Characterization of serum antibody response to chlamydiae in patients with sexually acquired reactive arthritis // *Pathogens and Disease*. - 1997. - Vol. 19(3). - P. 191–202.
4. Idahl A., Boman J., Kumlin U., Olofsson J.I. Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy // *Human Reproduction*. - 2004. - Vol.19 (5). - P. 1121–1126.
5. Ismail M.K. and Ali A.S. Evaluation of Chlamydia Trachomatis Antibodies In Women with Infertility // *Al-Mustansiriyah Journal of Science*. - 2012. - Vol. 23, No 3. - P. 21–28.
6. Keegan M.B., Diedrich J.T. and Peipert J.F. Chlamydia trachomatis Infection: Screening and Management // *Journal of Clinical Outcomes Management*. - 2014. - Vol.21 (1). - P. 30–38.
7. Vasilevsky S., Greub G., Nardelli-Haeffliger D. and Bauda D. Genital Chlamydia trachomatis: Understanding the Roles of Innate and Adaptive Immunity in Vaccine Research // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2014. - Vol. 27, No. 2. - P. 346–370.
8. Witkin S.S. Immunological aspects of genital chlamydia infections // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* - 2002. - Vol. 16. - P. 865–874.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002*// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 13.12.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»

ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки планшета внести по 80 µl [DIL|SAMPLE]
(коричневый цвет)

Внести по 40 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL|IgA|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|CONJ|IgG]
(зеленый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать на протяжении **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,25;$$

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

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL|-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс позитивности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

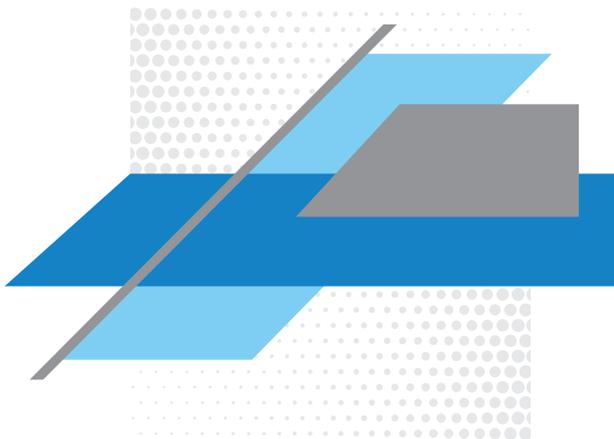
$IP_{\text{sample}} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



HBsAg

ИФА-набор для качественного обнаружения
поверхностного антигена вируса гепатита В

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-011

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI HBsAg

ИФА-набор для качественного обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «EQUI HBsAg» предназначен для качественного обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики гепатита В и скрининга донорской крови. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени; пациенты гемодиализа.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Одним из распространенных заболеваний печени является гепатит В. Его этиологический агент – вирус гепатита В (ВГВ). ВГВ относится к семейству *Herpesviridae* и содержит двухцепочечную ДНК. Инфекционной формой вируса являются так называемые частицы Дейна диаметром 42-49 нм, в белковом составе которых основными являются поверхностный антиген (HBsAg) и коровой антиген (HBcAg).

Клиническая картина гепатита В не позволяет диагностировать его длительное время и отличить от других вирусных гепатитов. Поэтому для скрининговых исследований и подтверждения диагноза важную роль играет лабораторная диагностика, особенно выявление антигенов ВГВ и антител к ним методом ИФА. Первым и основным маркером гепатита В является HBsAg, проявляющийся в крови через 3-5 недель после инфицирования. Приблизительно в то же время в крови можно обнаружить ДНК ВГВ и HBeAg, который считается маркером активной репликации вируса и «заразности» крови. ВОЗ рекомендует проводить проверку всей донорской крови на HBsAg, чтобы предотвратить трансмиссивную передачу ВГВ. Через 2-3 недели после появления HBsAg появляются антитела IgM к коровому антигену HBcAg, а вскоре после них – анти-HBcore IgG, быстро достигающие высоких уровней. Выздоровление от острого гепатита В сопровождается выведением вируса из организма, перестают выявляться HBsAg и анти-HBc IgM, появляются антитела к HBeAg. Антитела IgG к коровому антигену персистируют в течение всей жизни и являются маркером имеющегося или перенесенного гепатита В, их уровень в крови снижается медленно. Через несколько месяцев после

исчезновения из крови HBsAg начинают выявляться анти-HBs антитела, свидетельствующие о перенесенном гепатите В и наличии иммунитета. В период «серологического окна» между выводом HBsAg и появлением анти-HBs антител маркером инфекции ВГВ являются суммарные антитела к коровому антигену, также могут проявляться анти-HBe антитела.

Если после острой фазы не происходит элиминация вируса и не появляются анти-HBs антитела, развивается хронический гепатит В. HBsAg продолжает определяться более 6 месяцев, его количество в крови может значительно колебаться. На репликативной стадии хронического гепатита В находится ДНК вируса и HBeAg, антител к HBeAg нет.

ВОЗ рекомендует диагностировать острый гепатит В при наличии HBsAg и антител IgM к HBeAg, а хронический – при устойчивом присутствии HBsAg в течение не менее шести месяцев.

Главным средством профилактики гепатита В является вакцинация, рекомендованная в первую очередь новорожденным. После вакцинации организмом продуцируются анти-HBs антитела и формируется иммунитет у лиц, не соприкасавшихся с вирусом гепатита В. Наличие анти-HBs антител на уровне более 10 IU/l (МЕ/л) принято считать нижним пределом протективного иммунитета вследствие вакцинации или перенесенного гепатита В.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Обнаружение HBsAg в ИФА-наборе «EQUI HBsAg» базируется на принципе «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА в одноэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфические к HBsAg. В каждую лунку добавляются образцы сыворотки или плазмы пациента и конъюгат специфических к HBsAg антител с пероксидазой хрена. Во время инкубации исследуемых образцов и пероксидазного конъюгата в лунках планшета HBsAg, при наличии в образцах, связывается как с первыми антителами на твердой фазе, так и со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, образуя «сэндвич» антитело-антиген-антитело. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Иммуные комплексы обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству HBsAg в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

STRIPS

1 x 96
лунок

В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела к HBsAg. Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев

Позитивный контроль

CONTROL +

1 x 1,6 ml

Раствор поверхностного антигена вируса гепатита В в буфере с альбумином и консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

Негативный контроль

CONTROL -

2 x 1,6 ml

Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

Конъюгат (11x концентрат)

CONJ|11x

1 x 0,8 ml

11-кратный концентрат конъюгата моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый). Развести конъюгат (11x) 1:11 раствором для разведения конъюгата перед использованием (например, 50 µl концентрата + 500 µl раствора для разведения конъюгата, достаточно для 8 лунок). Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 суток

Раствор для разведения конъюгата

DIL|CONJ

1 x 8 ml

Буферный раствор с белками сыворотки крови крупного рогатого скота и иммуноглобулинами мыши с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор ТМБ (готов к использованию)

SOLN|TMB

1 x 13 ml

Раствор ТМБ, H₂O₂, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)

TWEEN|WASH|20x

1 x 50 ml

20-кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток

Стоп-раствор (готов к использованию)

SOLN|STOP

1 x 13 ml

Раствор 0,5 mol H₂SO₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (1 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термошейкер на 37°C или термостат на 42°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620–695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI HBsAg»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- [SOLN|TMB] должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта [SOLN|TMB] с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для раствора конъюгата и [SOLN|TMB];
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;

- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- [CONTROL+] ИФА-набора «EQUI HBsAg» содержит очищенный поверхностный антиген вируса гепатита В, выделенный с инаktivированным прогреванием сыворотки крови человека, в которой не было обнаружено антител к ВИЧ1/2, ВГС и *Treponema pallidum*, однако работать с контролем следует как с потенциально инфекционным материалом;
- [CONTROL-] ИФА-набора «EQUI HBsAg» протестирован и признан отрицательным на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и раствора конъюгата на слизистые или кожу, необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инаktivация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инаktivировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инаktivировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инаktivированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтнера и накрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления раствора для промывания разведите **TWEEN|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом

перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом: разведите [CONJ]11x (фиолетовый) в чистом флаконе раствором [DIL]CONJ (розовый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в фиолетовый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить до 500 µl [DIL]CONJ 50 µl [CONJ]11x. Раствор конъюгата в рабочем разведении стабильный в течение суток при условии хранения при температуре 2-8°C.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.

9.2. Заполните схему внесения образцов.

9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.

9.4. Приготовьте раствор конъюгата согласно пункту 8.3.

9.5. Внесите в лунки по 100 µl контролей и исследуемых образцов:

[CONTROL] + – в лунку A1,

[CONTROL] - – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

9.6. Внесите в лунки по 50 µl раствора конъюгата поверх контролей и исследуемых образцов. Для предотвращения кроссконтаминации образцов внесите раствор конъюгата, не касаясь содержания лунок. Осторожно постукивая по планшету, перемешайте смесь в лунках.

9.7. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 120 минут при 37°C и постоянном орбитальном перемешивании содержимого лунок со скоростью 300 об/мин. *Инкубацию образцов с конъюгатом в лунках ИФА-планшета можно проводить в течение 120 минут при температуре 42°C в статическом режиме. Однако при этом может наблюдаться снижение специфичности анализа.*

9.8. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

– удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;

– наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;

– аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;

- повторите процедуру промывания еще пять раз;
- после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

- 9.9. Внесите в лунки по 100 μl [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.10. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.11. Внесите в лунки стрипов по 100 μl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.
- 9.12. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП негативного контроля (\bar{N}_c) уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{N}_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3})/3; \quad CO = \bar{N}_c + 0,07$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

$$\text{[CONTROL|+]} \quad ОП \geq 1,5$$

$$\text{[CONTROL|-]} \quad ОП \leq 0,100$$

$$\text{[CONTROL|-]} \quad \bar{N}_c \times 0,5 \leq N_{cn} \leq \bar{N}_c \times 2,0 \quad \text{где } N_{cn} - \text{ОП каждого повтора } N_c$$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают \bar{N}_c по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

10.3. Интерпретация результатов

$OD_{\text{sample}} \geq CO$ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

$OD_{\text{sample}} < CO$ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ** , где OD_{sample} – ОП образца

* Первоначально положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках ИФА-набора «EQUI HBsAg». После повторного тестирования положительными считаются образцы, оптическая плотность которых хотя бы в одном из повторов превышает граничное значение. Если при повторном тестировании оптическая плотность образца в обоих повторах ниже граничного значения, такой образец считать отрицательным.

Результаты для образцов, ОП которых равно граничному значению или находится в пределах $\pm 10\%$, следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI HBsAg». Если при повторном тестировании OD_{sample} снова находится в пределах $\pm 10\%$ граничного значения, следует провести отбор и анализ нового образца.

** Образцы со значением оптической плотности ниже граничного значения считаются отрицательными в ИФА-наборе «EQUI HBsAg». Однако результаты в пределах 10% ниже граничного значения следует интерпретировать с осторожностью (рекомендуется повторно исследовать такие образцы в двух лунках набора ИФА).

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разной концентрацией поверхностного антигена оценивали в 32 повторах на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	CV, %
2	1,809	3,3
45/15	0,922	3,7

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	CV, %
2	1,827	5,6
45/15	0,936	5,8

Аналитическая чувствительность

Предел чувствительности анализа по обнаружению поверхностного антигена вируса гепатита В определяли на Британском стандартном образце 07/288-010 для HBsAg (Национальный институт биологических стандартов Соединенного королевства, NIBSC) и подтверждали с использованием Третьего Международного Стандарта для HBsAg 12/226 (Third International Standard for HBsAg, производства NIBSC). Предел чувствительности ИФА-набора «EQUI HBsAg» составил 0,05 IU/ml (МЕ/мл).

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,1 mg/ml (172,3 μ mol/l), гемоглобина в концентрации до 5 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности и специфичности наборов «EQUI HBsAg» использовали 57 образцов сывороток, полученных от пациентов с диагнозом гепатит В, и 294 образца сывороток клинически здоровых доноров (сероотрицательных по отношению к вирусу гепатита В). Кроме того, были использованы образцы из коммерческих панелей производства «SeraCare Life Sciences» (США). По результатам анализа клиническая чувствительность ИФА-набора составляет 100%, клиническая специфичность – 100%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичной коммерческой тест-системой проводилось на целевой группе беременных женщин (171 образец). Для выборки беременных женщин относительная специфичность составляла 100%, процент совпадения – 100%.

Положительная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI HBsAg» составляет 100%, отрицательная прогностическая ценность (NPV) – 100%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI HBsAg» показывает, что тестируемый образец не содержит HBsAg или его концентрация ниже 0,05 IU/ml (МЕ/мл). Поскольку образец может содержать HBsAg в очень низкой концентрации, отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI HBsAg» не позволяет полностью исключить инфицирование вирусом гепатита В.

Кроме того, в литературных источниках описаны некоторые примеры вирусного гепатита В (острого или хронического), когда в образце обнаруживалась вирусная ДНК при отсутствии HBsAg. В таких случаях полезным будет исследование образца на другие маркеры вирусного гепатита В, выявление ДНК и оценка биохимических показателей сыворотки крови пациента.

Для верификации специфичности реакции каждый положительный результат (согласно критериям интерпретации ИФА-набора «EQUI HBsAg») необходимо подтвердить в нейтрализационном ИФА с использованием комплекта реагентов «EQUI HBsAg Confirmation». Для корректной диагностики гепатита В рекомендуется провести исследование образца на наличие специфических антител классов IgM и IgG к HBcore антигену и антител к HBsAg (например, в ИФА-наборах «EQUI HBcore IgM», «EQUI HBcore IgG» и «EQUI anti-HBs», соответственно).

В целях нивелирования ложноположительных результатов, вызванных наличием в образцах сывороток крови человека антител, специфических к иммуноглобулинам мыши, в ИФА-наборе используется специальный блок-компонент, препятствующий формированию иммунных комплексов с антимышиными антителами (англ. НАМА) на твердой фазе.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // *Clinical Microbiology Review* – 1999. – Vol.12, N 2 - P.351–366.
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // *Clin. Lab.* - 2001. - Vol. 47, N 1-2. - P.51-55.
3. Spradling P.R., Xing J., Williams R. et al. Immunity to Hepatitis B Virus (HBV) Infection Two Decades after Implementation of Universal Infant HBV Vaccination: Association of Detectable Residual Antibodies and Response to a Single HBV Challenge Dose // *Clinical and Vaccine Immunology.* - 2013. - Vol.20, N 4. - P.559–561.
4. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // *Postgraduate Medical Journal* - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
5. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // *Інфекційні та паразитарні хвороби: В 3 т. – К.:»Здоров'я», 2001. т.1. – С.601-614.*
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. Stockholm: 2016.
7. CDC Hepatitis B Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm>.
8. World Health Organization (WHO). WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України.* - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.

	Производитель
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер по каталогу
	Дата изготовления
	Использовать до
	Код партии
	Температурное ограничение
	Содержит достаточно для (n-) испытаний
	Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами
	Ознакомление с инструкцией по применению
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 8 от 21.09.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквитестлаб»
ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

Внести по 100 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы

В лунки стрипов внести по 50 µl приготовленного 1:11 (1+10) раствора конъюгата.
(фиолетовый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **120 мин при температуре 37°C** и постоянном орбитальном перемешивании содержимого лунок со скоростью 300 об/мин

Промыть лунки 6 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать на протяжении **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,07;$$

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

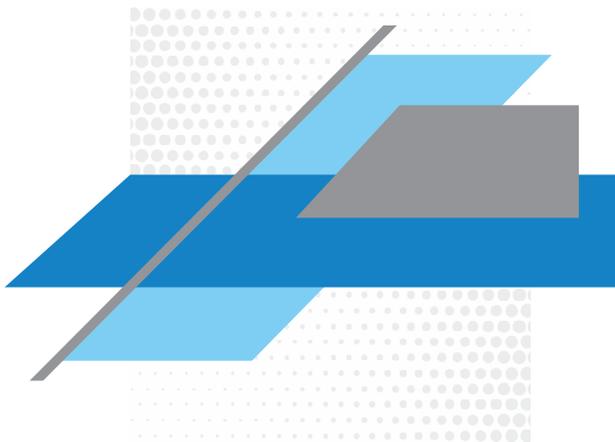
$OD_{\text{sample}} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{\text{sample}} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Mycoplasma hominis IgG

ИФА-набор для качественного и полуколичественного
обнаружения антител класса IgG к *Mycoplasma hominis*

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-201

Σ 96
анализов



EQUI *Mycoplasma hominis* IgG

ИФА-набор для качественного и полуколичественного обнаружения антител класса IgG к *Mycoplasma hominis*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI *Mycoplasma hominis* IgG» предназначен для качественного и полуколичественного выявления антител класса IgG к *Mycoplasma hominis* в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики микоплазмоза. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: пациенты с симптомами заболеваний органов мочеполовой системы; беременные женщины или дети, рожденные от инфицированных матерей

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях и других учреждениях, работающих в области диагностики *in vitro*.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Mycoplasma hominis считаются условно-патогенными паразитами человека, связанными с урогенитальной микоплазменной инфекцией – микоплазмозом. Эти микроорганизмы обнаруживаются у 10-50% здоровых людей, но при определенных состояниях они вызывают инфекцию половых органов, а при ослаблении иммунитета могут приводить к септическим поражениям. Кроме того, микоплазменная инфекция может стать причиной бесплодия или патологии беременности. Распространенность и возможность передачи *M. hominis* среди женщин выше, чем среди мужчин: их носителями считают до 50% взрослых женщин и до 20% мужчин.

Микоплазмы – это грамотрицательные мелкие (0,3–0,7 μm) бактерии класса *Mollicutes*, не имеющие клеточной стенки. Эти микроорганизмы являются поверхностными паразитами: как правило, они прикрепляются к мембране клетки-хозяина, хотя имеют механизмы, позволяющие им попадать внутрь клетки и выживать в ней. Кроме того, микоплазмы достаточно устойчивы во влажной среде, что увеличивает риск инфицирования здоровых людей и детей.

Среди взрослых *M. hominis* чаще всего передается половым или орально-половым путём. Другим важным механизмом передачи является вертикальное от матери ребенку, при чем возможно как внутриутробное инфицирование плода, так и заражение при родах. Также считают, что *M. hominis* может передаваться контактно-бытовым путем посредством совместного использования белья, одежды, предметов гигиены и т.п.

У здоровых лиц-носителей *M. hominis* не вызывает отрицательных изменений, пока не начнется активная колонизация урогенитального тракта

бактериями под влиянием неблагоприятных факторов (стресс, гормональные изменения, ослабление иммунитета, беременность и т.п.). Микоплазмоз в 40% протекает бессимптомно, а в остальных случаях клинические проявления заболевания не отличаются от других урогенитальных инфекций. У мужчин могут развиваться уретриты, эпидидимиты, простатиты, а также мужское бесплодие. У женщин микоплазмы могут поражать уретру, влагалище, яичники, матку и маточные трубы, вызывая тем самым уретриты, цервициты, вагинозы и воспалительные заболевания органов малого таза (сальпингиты, оофориты, эндометриты и другие). Микоплазменная инфекция может привести к развитию женского бесплодия. У беременных *M. hominis* может стать причиной невынашивания плода, самопроизвольного аборта, преждевременных родов, а также послеродового сепсиса. При инфицировании плода могут развиваться поражения внутренних органов – дыхательной системы, печени, почек, ЦНС. У новорожденных микоплазменная инфекция может приводить к лихорадке и пневмонии.

Для диагностики урогенитального микоплазмоза используют как прямые, так и косвенные методы. Наиболее распространены культуральные (позволяют выявить возбудителя и оценить его количество и чувствительность к антибиотикам), ПЦР (высокочувствительный качественный и количественный анализ ДНК *M. hominis* в образцах) и серологические методы, например ИФА (обнаружение антител к антигенам возбудителя). Из-за низких иммуногенных свойств микоплазм при применении серологических методов могут случаться ложноотрицательные результаты. Выявление специфических к *M. hominis* антител класса IgG свидетельствует об имеющейся паст-инфекции, а резкое нарастание их титров позволяет дифференцировать активную стадию заболевания. Анализ специфических IgA-антител к *M. hominis* в динамике может являться маркером эффективности проводимой терапии. Таким образом, использование серологических методов в комплексе с другими лабораторными данными помогает установить стадию и характер заболевания.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфичных до *M. hominis*, специфичных к *M. hominis*, в ИФА-наборе «EQUI Mycoplasma hominis IgG» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены *M. hominis*. При первом этапе инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфичны к *M. hominis* антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина

(ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS	1 x 96 лунок	Планшет ИФА В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены <i>M. hominis</i> . Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев
CONTROL+	1 x 0,6 ml	Позитивный контроль Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
CONTROL-	1 x 1,6 ml	Негативный контроль Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
DIL SAMPLE	1 x 11 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (фиолетовый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (оранжевый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
TRITON WASH 20x	1 x 50 ml	Раствор для промывки TRITON (20x концентрат) 20-кратный концентрат фосфатного буфера с Тритоном X-100 (бесцветный). Развести раствор для промывки TRITON (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 мл концентрата + 95 мл воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток
SOLN STOP	1 x 13 ml	Стоп-раствор (готов к использованию) Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники для них, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по использованию. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI *Mycoplasma hominis* IgG»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- [SOLN|TMB] должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта [SOLN|TMB] с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для [SOLN|CONJ] и [SOLN|TMB];
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;

- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI Mycoplasma hominis IgG» протестированы и признаны негативными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ] на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при

температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтнера и накрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите **TRITON|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, что достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате промывочного раствора прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8°C

в пределах 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 μ l [DIL|SAMPLE].
- 9.5. Внесите в лунки по 40 μ l контролей и исследуемых образцов:
[CONTROL+] – в лунку A1,
[CONTROL-] – в лунки B1, C1, D1,
в остальные лунки – исследуемые образцы
При внесении происходит изменение цвета раствора с фиолетового на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.
- 9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 μ l раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 μ l;
 - повторите процедуру промывания еще пять раз;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Внесите в лунки по 100 μ l [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Внесите в лунки по 100 μ l [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 μ l [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, соблюдая ту же последовательность, что и при внесении [SOLN|TMB]. При внесении происходит изменение цвета

раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором несколько меняется оттенок.

9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. Перед проведением измерения убедитесь в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установки бланка (в такую лунку внесите только и).

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Вычислите среднее значение ОП негативного контроля (\bar{Nc}) и уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс положительности образца (IP_{sample}).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,3$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}}/CO, \text{ где } OD_{\text{sample}} - \text{ОП образца}$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

$$\text{CONTROL}+ \quad ОП \geq 1,2$$

$$\text{CONTROL} - \quad ОП \leq 0,150$$

$$\text{CONTROL} - \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{где } Ncn - \text{ОП каждого повтора } Nc$$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отвергают и рассчитывают \bar{Nc} по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не соответствует указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного выполнения.

10.3. Интерпретация результатов

$$\begin{array}{ll} IP_{\text{sample}} > 1,1 & \text{ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ} \\ 0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1 & \text{НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*} \\ IP_{\text{sample}} < 0,9 & \text{ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ} \end{array}$$

* Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно в двух лунках набора ИФА. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует провести отбор и анализ нового образца через 7-14 дней. В случае повторного получения неопределенных результатов такие образцы считать негативными.

Использование индекса положительности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических

антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели. При этом следует учитывать, что IP_{sample} в пределах 1,1 – 7,0 пропорционален содержанию специфических антител. Если IP_{sample} составляет выше 7,0, для корректной оценки содержания специфических антител рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разбавленного в 10 раз. При определении конечного результата в таком случае следует умножить полученное значение IP_{sample} на степень разведения ($\times 10$).

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
133	1,151	3,60	4,2
349	1,061	3,31	4,1

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 3 дней в 3 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
133	1,060	3,18	9,8
83	0,390	1,17	5,5

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 μ mol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 5 mg/ml (5,65 mmol/l).

11.2. Диагностические характеристики

Диагностические характеристики ИФА-наборов «EQUI Mycoplasma hominis IgG» оценивали, исследуя 21 образец, охарактеризованный как положительный на антитела класса IgA к *M. hominis*, и целевую группу сывороток беременных (187 образцов) по сравнению с аналогичными коммерческими наборами. Для данных выборок относительная чувствительность наборов «EQUI Mycoplasma hominis IgG» составила 100%, относительная специфичность – 94,8%, а процент совпадения – 92,3%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI Mycoplasma hominis IgG» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфичных к *M. hominis*, которые продуцируются организмом при инфицировании этим возбудителем.

Отсутствие антител класса IgG, специфичных к *M. hominis*, не исключает наличия инфекции, вызванной *M. hominis*.

Определение специфических к *M. hominis* антител в иммуноферментном анализе особенно информативно при длительной и восходящей инфекции.

Для корректной диагностики микоплазмоза также следует определить уровень специфических к *M. hominis* антител класса IgG в парных образцах, полученных с интервалом забора крови не менее двух недель. Двух-трехкратное повышение уровня антител свидетельствует об активности инфекционного процесса. Кроме того, рекомендуется провести исследования по выявлению *M. hominis* культуральным методом (посев) или с помощью ПЦР. Для постановки диагноза следует учитывать результаты комплексных лабораторных исследований (серологические и прямые методы диагностики), так и клинические проявления заболевания.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmadi M. H., Mirsalehian A., and Bahador A. Prevalence of Urogenital Mycoplasmas in Iran and Their Effects on Fertility Potential: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Iranian Journal of Public Health*. - 2016. - Vol. 45(4). – P. 409–422.
2. Baseman J. B. and Tully J. G. Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by Their Notoriety // *Emerging Infectious Diseases*. - 1997. - Vol. 3, No. 1. - P. 21–32.
3. Kwak D.-W., Hwang H.-S. et al. Co-infection with vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. - 2014. - Vol. 27. - P. 333–337.
4. Ljubin-Sternak S. and Meštrović T. Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health // *Journal of Pathogens*. - 2014. – P. 15.
5. Luttrell L. M., Kanj S. S. et al. *Mycoplasma hominis* septic arthritis: two case reports and review // *Clinical Infectious Diseases*. - 1994. - Vol. 19 (6). - P. 1067-1070.
6. Mihai M., Valentin N. et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated during a population-based study concerning women infertility in northeast Romania // *Brazilian Journal of Microbiology*. - 2011. - Vol. 42, No. 1. - P. 256–260.
7. Waites K.B., Katz B., Schelonka R.L. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical Microbiology Review*. - 2005. - Vol. 18. - P. 757-789.
8. Zdrodowska-Stefanow B., Kłosowska W.M. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases // *Advances in Medical Sciences*. - 2006. - Vol. 51. - P. 250–253.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002*// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.

-  Производитель
-  Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
-  Номер по каталогу
-  Дата изготовления
-  Использовать до
-  Код партии
-  Температурное ограничение
-  Содержит достаточно для (n-) испытаний
-  Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами
-  Ознакомление с инструкцией по применению
-  Беречь от прямых солнечных лучей
-  Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 23.10.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»
ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки планшета внести по 80 µl **[DIL|SAMPLE]**
(фиолетовый цвет)

Внести по 40 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – **[CONTROL|+]**, B1, C1, D1 – **[CONTROL|-]**,
E1 ти в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с фиолетового на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 мин при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывочным раствором TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl **[SOLN|CONJ]**
(оранжевый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 мин при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl **[SOLN|TMB]**

Инкубировать в течение **30 мин в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl **[SOLN|STOP]**
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х **[CONTROL|-]**

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс положительности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

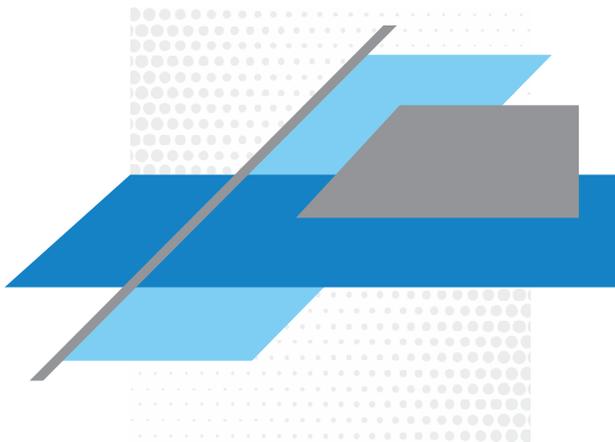
$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Ureaplasma urealyticum IgG

ИФА-набор для качественного и полуколичественного
обнаружения антител класса IgG к *Ureaplasma urealyticum*

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-301

Σ 96
анализов



EQUI *Ureaplasma urealyticum* IgG

ИФА-набор для качественного и полуколичественного обнаружения антител класса IgG к *Ureaplasma urealyticum*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI *Ureaplasma urealyticum* IgG» предназначен для качественного и полуколичественного выявления антител класса IgG к *Ureaplasma urealyticum* в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики уреоплазмоза. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: пациенты с симптомами заболеваний органов мочеполовой системы; беременные женщины или дети, рожденные от инфицированных матерей.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях и других учреждениях, работающих в области диагностики *in vitro*.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Ureaplasma urealyticum называют этиологическим агентом инфекции уrogenитального тракта – уреоплазмоза. Вместе с тем уреоплазмы являются представителями нормальной микрофлоры половых органов мужчин и женщин и не вызывают заболевания, пока их количество не превысит определенный порог. Однако при определенных условиях уреоплазмы активно размножаются и вызывают поражение, которое может привести к патологиям беременности, а также мужскому и женскому бесплодию. В зависимости от региона *U. urealyticum* выявляется у 10–80% здоровых лиц и считается условным патогеном человека. Эти бактерии являются одними из распространенных возбудителей инфекционных заболеваний мочеполовой системы человека.

Уреоплазмы относятся к классу *Mollicutes*, иногда их называют представителями уrogenитальных микоплазм – мелких бактерий, не имеющих клеточной стенки. Клетка такого микроорганизма окружена трехслойной липидной мембраной, которая не является жесткой и позволяет изменять форму. Эти микроорганизмы являются поверхностными паразитами и прикрепляются к мембране клетки-хозяина. Из-за отсутствия клеточной стенки уреоплазмы, как и микоплазмы, нечувствительны к пенициллину и другим подобным механизмом действия антибиотикам. Также следует отметить наличие в *U. urealyticum* протеаз, которые способны разрушать антитела класса IgA, производимые слизистой, что способствует колонизации микроорганизмов. Кроме того, эти бактерии достаточно устойчивы во влажной среде, что увеличивает риск инфицирования здоровых людей и детей. Чаще *U. urealyticum* передается при половом

контакте и бытовым путем. Вместе с тем, уреоплазмоз официально не относится к группе заболеваний, передающихся половым путем (ЗППП).

Уреоплазменная инфекция может протекать бессимптомно или с неспецифическими клиническими проявлениями, характерными для других заболеваний урогенитального тракта. У мужчин инфицирование уреоплазмами приводит к развитию уретритов, эпидидимитов и простатитов. Кроме того, уреоплазмы могут присоединяться к сперматозоидам и снижать их подвижность. Вместе с воспалением мужских половых органов в результате уреоплазменной инфекции это может приводить к мужскому бесплодию. У женщин *U. urealyticum* может вызвать воспалительные процессы в органах малого таза, а также уретриты, цервициты, вагинозы. Уреоплазменная инфекция и связанное с ней воспаление может стать причиной рубцевания тканей и, как следствие, развития женского бесплодия. Так, у трети женщин с диагностированным бесплодием обнаруживают возбудитель уреоплазмоза. Также уреоплазмы в амниотической жидкости могут провоцировать преждевременный разрыв плодных оболочек и приводить к спонтанным абортam и преждевременным родам. В случае инфицирования плода наиболее часто наблюдаются проблемы с дыхательной системой у новорожденных.

В связи с отсутствующими или неспецифическими проявлениями уреоплазменную инфекцию чаще всего диагностируют культуральными методами (посевами), с помощью ПЦР с обнаружением ДНК возбудителя, а также серологическими методами с обнаружением антител к антигенам уреоплазм. Выявление специфических IgG антител к *U. urealyticum* свидетельствует об имеющейся или перенесенной инфекции. Для дифференциации этих состояний дополнительно определяют специфические антитела IgA класса, которые могут проявляться при острой стадии заболевания. Однако для более корректной постановки диагноза следует дополнительно использовать данные других лабораторных исследований, особенно количественный бактериальный или ПЦР анализ.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфичных к *U. urealyticum*, в ИФА-наборе «EQUI Ureaplasma urealyticum IgG» основано на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены *U. urealyticum*. При первом этапе инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфичны к *U. urealyticum* антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина

(ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS	1 x 96 лунок	Планшет ИФА В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены <i>U. urealyticum</i> . Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев
CONTROL+	1 x 0,35 ml	Позитивный контроль Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
CONTROL-	1 x 1,2 ml	Негативный контроль Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
DIL SAMPLE	1 x 11 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат) 20-кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 мл концентрата + 95 мл воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток
SOLN STOP	1 x 13 ml	Стоп-раствор (готов к использованию) Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники для них, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по использованию. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI Ureaplasma urealyticum IgG»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- **SOLN|TMB** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта **SOLN|TMB** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для **SOLN|CONJ** и **SOLN|TMB**;
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;

- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI Ureaplasma urealyticum IgG» протестированы и признаны негативными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ] на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при

температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтнера и накрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите **TWEEN|WASH|20x** дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, что достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате промывочного раствора прогрейте

флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8°C в пределах 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl [DIL|SAMPLE].
- 9.5. Внесите в лунки по 20 µl контролей и исследуемых образцов:
[CONTROL|+] – в лунку A1,
[CONTROL|-] – в лунки B1, C1, D1,
в остальные лунки – исследуемые образцы
При внесении происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.
- 9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
 - повторите процедуру промывания еще пять раз;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, соблюдая ту же последовательность, что и при внесении [SOLN|TMB]. При внесении происходит изменение цвета

раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором несколько меняется оттенок.

9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Перед проведением измерения убедитесь в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае оставьте лунку для установки бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Вычислите среднее значение ОП негативного контроля (\bar{N}_c) и уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс положительности образца (IP_{sample}).

$$\bar{N}_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3})/3; \quad CO = \bar{N}_c + 0,3$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}}/CO, \text{ где } OD_{\text{sample}} - \text{ОП образца}$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

$$\boxed{\text{CONTROL}+} \quad ОП \geq 1,2$$

$$\boxed{\text{CONTROL}-} \quad ОП \leq 0,150$$

$$\boxed{\text{CONTROL}-} \quad \bar{N}_c \times 0,5 \leq N_{cn} \leq \bar{N}_c \times 2,0 \quad \text{где } N_{cn} - \text{ОП каждого}$$

повтора N_c

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отвергают и рассчитывают \bar{N}_c по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не соответствует указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного выполнения.

10.3. Интерпретация результатов

$$\begin{array}{ll} IP_{\text{sample}} > 1,1 & \text{ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ} \\ 0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1 & \text{НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*} \\ IP_{\text{sample}} < 0,9 & \text{ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ} \end{array}$$

* Неопределенные образцы рекомендуется изучить повторно. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует провести отбор и анализ нового образца.

Использование индекса положительности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели. При этом следует учитывать, что IP_{sample} в пределах 1,1 – 7,0 пропорционален содержанию специфических антител.

Если IP_{sample} составляет выше 7,0, для корректной оценки содержания специфических антител рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разбавленного в 10 раз. При определении конечного результата в таком случае следует умножить полученное значение IP_{sample} на степень разведения ($\times 10$).

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
278	2,266	6,62	8,6
283	0,910	2,66	3,6

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
278	2,039	5,85	7,2
283	0,889	2,55	8,3

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 $\mu\text{mol/l}$), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

11.2. Диагностические характеристики

Диагностические характеристики ИФА-наборов «EQUI Ureaplasma urealyticum IgG» оценивали, исследуя 18 образцов, охарактеризованных как положительные на антитела класса IgG к *U. urealyticum*, и целевую группу сывороток беременных (145 образца) по сравнению с аналогичными коммерческими наборами. Для данных выборок относительная чувствительность наборов «EQUI Ureaplasma urealyticum IgG» составила 100%, относительная специфичность – 90,2%, а процент совпадения – 90,4%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI Ureaplasma urealyticum IgG» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG,

специфичных к *U. urealyticum*, продуцируемым организмом при инфицировании возбудителем уреоплазмоза.

Следует заметить, что в случае раннего уреоплазмоза результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител на начальном этапе заболевания. Поэтому отсутствие антител класса IgG, специфичных к *U. urealyticum*, не исключает наличия уреоплазменной инфекции.

Определение специфических к *U. urealyticum* антител в иммуноферментном анализе особенно информативно при длительной и восходящей инфекции. Для постановки диагноза следует учитывать как результаты комплексных лабораторных исследований (серологические и прямые методы диагностики), так и клинические проявления заболевания.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmadi M. H., Mirsalehian A., and Bahador A. Prevalence of Urogenital Mycoplasmas in Iran and Their Effects on Fertility Potential: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Iranian Journal of Public Health*. - 2016. - Vol. 45(4). - P: 409–422.
2. Kwak D.-W., Hwang H.-S. et al. Co-infection with vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. - 2014. - Vol. 27. - P. 333–337.
3. Larsen B., Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look // *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. - 2010. - Vol. 2010. – P. 7.
4. Ljubin-Sternak S. and Meštrović T. *Chlamydia trachomatis* and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health // *Journal of Pathogens*. - 2014. – P. 15.
5. Mihai M., Valentin N. et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated during a population-based study concerning women infertility in northeast Romania // *Brazilian Journal of Microbiology*. - 2011. - Vol. 42, No. 1. - P. 256–260.
6. Waites K. B., Katz B., Schelonka R. L. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical Microbiology Review*. - 2005. - Vol. 18. - P. 757-789.
7. Zdrodowska-Stefanow B., Kłosowska W.M. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases // *Advances in Medical Sciences*. - 2006. - Vol. 51. - P. 250–253.
8. Zeighami H., Peerayeh S. N. et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men // *International Journal of STD and AIDS*. - 2009. - Vol.20. - P. 387–390.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002*// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 6 от 27.10.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»

ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки планшета внести по 80 µl [DIL|SAMPLE]
(коричневый цвет)

Внести по 20 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
E1 ти в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 мин при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывочным раствором TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|CONJ]
(зеленый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 мин при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывочным раствором TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать в течение **30 мин в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,3;$$

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

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL|-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс положительности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{\text{sample}} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ