

исх. № 16.02.2021/2
от 16.02.2021

Письмо об Авторизации

Настоящим письмом ООО «Витротест Биореагент», производитель иммуноферментных тест-систем под торговой маркой «Vitrotest®», подтверждает, что компания Sanmedico SRL является авторизованным дистрибьютором нашей компании на территории - Республики Молдова, обладающим правами по продаже продвижению и участию в тендерных торгах с нашей продукцией.

Директор ООО "Витротест Биореагент"



к.м.н. Николаенко И.В.



СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА (ПАСПОРТ)

На иммуноферментную тест-систему «**Vitrotest Anti-Lambliа**»
для выявления антител к ***Giardia lamblia (intestinalis)***

Серия: 0420

Дата изготовления: 2020-09-16

Срок годности: 2021-09-16

Каталожный номер и вариант комплектации: ТК030 96-1Т

Комплектность тест-системы и срок годности компонентов

Компонент	Серия	Срок годности
ИФА - планшет	0420	2022/06/03
Положительный контроль	0420	2022/06/14
Отрицательный контроль	0420	2022/06/14
Раствор для промывания Tw20 (20х) (концентрат)	0920	2022/09/11
Раствор для разведения сывороток	0520	2022/06/02
Раствор конъюгата	0420	2022/06/02
Раствор ТМБ	0920	2022/09/07
Стоп - реагент	0720	2022/09/11
Клейкая пленка	x	Неограниченный
Бланк внесения проб	x	Неограниченный
Инструкция	Редакция 2	Неограниченный

Диагностические характеристики тест-системы

Показатель	Результат контроля	Требования нормативной документации
ОП положительного контроля (450/620 нм)	2,596 ОО	≥ 1,200 ОО
ОП отрицательного контроля (450/620 нм)	0,024 ОО	≤ 0,150 ОО
Чувствительность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %
Специфичность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %

Вывод:

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest Anti-Lambliа» для выявления антител к *Giardia lamblia (intestinalis)* серии 0420 соответствует требованиям ТУ У 24.4-36555928-001:2011 и инструкции по применению.

Дата: 2020/09/22

Документ сгенерирован в электронном виде.

Действителен без подписи.

СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА (ПАСПОРТ)

На иммуноферментную тест-систему «Vitrotest Anti-Ascaris» для выявления антител к *Ascaris lumbricoides*

Серия: 0420

Дата изготовления: 2020-10-01

Срок годности: 2021-10-01

Каталожный номер и вариант комплектации: ТК051 96-1Т

Комплектность тест-системы и срок годности компонентов

Компонент	Серия	Срок годности
ИФА - планшет	0420	2022/06/24
Положительный контроль	0420	2022/06/25
Отрицательный контроль	0420	2022/06/25
Раствор для промывания Tw20 (20x) (концентрат)	1020	2022/09/17
Раствор для разведения сывороток	0420	2022/06/22
Раствор конъюгата	0420	2022/06/22
Раствор ТМБ	1020	2022/09/17
Стоп - реагент	0820	2022/09/29
Клейкая пленка	x	Неограниченный
Бланк внесения проб	x	Неограниченный
Инструкция	Редакция 2	Неограниченный

Диагностические характеристики тест-системы

Показатель	Результат контроля	Требования нормативной документации
ОП положительного контроля (450/620 нм)	2,811 ОО	≥ 1,200 ОО
ОП отрицательного контроля (450/620 нм)	0,015 ОО	≤ 0,150 ОО
Чувствительность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %
Специфичность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %

Вывод:

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest Anti-Ascaris» для выявления антител к *Ascaris lumbricoides* серии 0420 соответствует требованиям ТУ У 24.4-36555928-001:2011 и инструкции по применению.

Дата: 2020/10/02

Документ сгенерирован в электронном виде.

Действителен без подписи.

**СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА (ПАСПОРТ)
на иммуноферментную тест-систему «Vitrotest Anti-Toxocara»
для выявления антител к *Toxocara canis***

Серия: 0420

Дата изготовления: 2020-09-21

Срок годности: 2021-09-21

Каталожный номер и вариант комплектации: ТК058 96-1Т

Комплектность тест-системы и срок годности компонентов

Компонент	Серия	Срок годности
ИФА - планшет	0420	2022/06/16
Положительный контроль	0420	2022/06/17
Отрицательный контроль	0420	2022/06/17
Раствор для промывания Tw20 (20х) (концентрат)	0920	2022/09/11
Раствор для разведения сывороток	0420	2022/06/15
Раствор конъюгата	0420	2022/06/15
Раствор ТМБ	0920	2022/09/07
Стоп - реагент	0720	2022/09/11
Клейкая пленка	x	Неограниченный
Бланк внесения проб	x	Неограниченный
Инструкция	Редакция 2	Неограниченный

Диагностические характеристики тест-системы

Показатель	Результат контроля	Требования нормативной документации
ОП положительного контроля (450/620 нм)	3,332 ОО	≥ 1,200 ОО
ОП отрицательного контроля (450/620 нм)	0,016 ОО	≤ 0,150 ОО
Чувствительность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %
Специфичность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %

Вывод:

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest Anti-Toxocara» для выявления антител к *Toxocara canis* серии 0420 соответствует требованиям ТУ У 24.4-36555928-001:2011 и инструкции по применению.

Дата: 2020/09/22

Документ сгенерирован в электронном виде.

Действителен без подписи.



СЕРТИФІКАТ

CERTIFICATE * CERTIFICAT * ZERTIFIKAT * СЕРТИФИКАТ * CERTIFICADO

ОРГАН СЕРТИФІКАЦІЇ СИСТЕМ УПРАВЛІННЯ
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ЗАСВІДЧУЄ, ЩО

СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКІСТЮ

ТОВАРИСТВА З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

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

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

код ЄДРПОУ 42149820

СТОСОВНО
розроблення та виробництва тест-систем імуноферментних

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

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

Заступник керівника
Органу сертифікації

В.Д. Ример



№ 80020
ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1

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

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

ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ №UA-TK030

Виробник:

Товариство з обмеженою відповідальністю
«Вітротест Біореагент»
код ЄДРПОУ 42149820

Місцезнаходження виробника:

вул. М. Бойчука 18Б, офіс 56, м. Київ, 01103, Україна

Опис продукту:

Назва	Каталожний номер
Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до <i>Giardia lamblia (intestinalis)</i> «Vitrotest Anti-Lamblia»	TK030

Класифікація

згідно Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

Не відноситься до переліку А та В, не є виробом для самоконтролю, не для оцінки характеристик

Процедура оцінки відповідності:

Додаток 3 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

ТОВ "Вітротест Біореагент" декларує виконання всіх вимог до виробу, зазначеного вище, згідно Додатку 1 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754, та вимог наступних стандартів:

ДСТУ EN ISO 13485:2018

ДСТУ EN ISO 14971:2015

ДСТУ EN 13641:2015

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

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

Декларацію складено під цілковиту відповідальність виробника.

Дата видачі декларації: 31.10.2019

Термін дії декларації до: 31.10.2024

Директор



к.м.н. І.В. Ніколаєнко



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ №UA-TK051

Виробник:

Товариство з обмеженою відповідальністю
«Вітротест Біореагент»
код ЄДРПОУ 42149820

Місцезнаходження виробника:

вул. М. Бойчука 18Б, офіс 56, м. Київ, 01103, Україна

Опис продукту:

Назва	Каталожний номер
Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до <i>Ascaris lumbricoides</i> «Vitrotest Anti-Ascaris»	TK051

Класифікація

згідно Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

Не відноситься до переліку А та В, не є виробом для самоконтролю, не для оцінки характеристик

Процедура оцінки відповідності:

Додаток 3 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

ТОВ "Вітротест Біореагент" декларує виконання всіх вимог до виробу, зазначеного вище, згідно Додатку 1 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754, та вимог наступних стандартів:

ДСТУ EN ISO 13485:2018

ДСТУ EN ISO 14971:2015

ДСТУ EN 13641:2015

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

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

Декларацію складено під цілковиту відповідальність виробника.

Дата видачі декларації: 31.10.2019

Термін дії декларації до: 31.10.2024

Директор



к.м.н. І.В. Ніколаєнко



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ №UA-TK052

Виробник:

Товариство з обмеженою відповідальністю «Вітротест Біореагент»
код ЄДРПОУ 42149820

Юридична адреса виробника:

вул. М. Бойчука 18Б, офіс 56, м. Київ, 01103, Україна

Адреса виробництва:

вул. Курортна, 11, м. Київ, 04075, Україна

Опис продукту:

Назва	Каталожний номер
Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgM до капсидного антигену вірусу Епштейна-Барр (VCA) «Vitrotest EBV VCA-IgM»	TK052
Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgG до капсидного антигену вірусу Епштейна-Барр (VCA) «Vitrotest EBV VCA-IgG»	TK053
Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgG до ядерного антигену вірусу Епштейна-Барр (EBNA-1) «Vitrotest EBNA-IgG»	TK054

Класифікація

згідно Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

Не відноситься до переліку А та В, не є виробом для самоконтролю, не для оцінки характеристик

Процедура оцінки відповідності:

Додаток 3 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

ТОВ "Вітротест Біореагент" декларує виконання всіх вимог до виробу, зазначеного вище, згідно Додатку 1 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754, та вимог наступних стандартів:

ДСТУ EN ISO 13485:2018
ДСТУ EN ISO 14971:2015
ДСТУ EN 13641:2015
ДСТУ EN ISO 15223-1:2018 (EN ISO 15223-1:2016, IDT; ISO 15223-1:2016, Corrected version 2017-03, IDT)
ДСТУ EN ISO 23640:2015 (EN ISO 23640:2015, IDT; ISO 23640:2011, IDT)
ДСТУ EN 13612:2015
ДСТУ EN ISO 18113-1:2018 (EN ISO 18113-1:2011, IDT; ISO 18113-1:2009, IDT)
ДСТУ EN ISO 18113-2:2018 (EN ISO 18113-2:2011, IDT; ISO 18113-2:2009, IDT)
ДСТУ EN 980:2007

Декларацію складено під цілковиту відповідальність виробника.

Дата видачі декларації: 13.02.2020
Термін дії декларації до: 13.02.2025

Директор



К.М.Н. І.В. Ніколаєнко
(підп.)

ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ №UA-TK058

Виробник:

Товариство з обмеженою відповідальністю
«Вітротест Біореагент»
код ЄДРПОУ 42149820

Місцезнаходження виробника:

вул. М. Бойчука 18Б, офіс 56, м. Київ, 01103, Україна

Опис продукту:

Назва	Каталожний номер
Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до <i>Toxocara canis</i> «Vitrotest Anti-Toxocara»	TK058

Класифікація

згідно Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

Не відноситься до переліку А та В, не є виробом для самоконтролю, не для оцінки характеристик

Процедура оцінки відповідності:

Додаток 3 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754

ТОВ "Вітротест Біореагент" декларує виконання всіх вимог до виробу, зазначеного вище, згідно Додатку 1 Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою КМУ від 02.10.2013 №754, та вимог наступних стандартів:

ДСТУ EN ISO 13485:2018

ДСТУ EN ISO 14971:2015

ДСТУ EN 13641:2015

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

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

Декларацію складено під цілковиту відповідальність виробника.

Дата видачі декларації: 31.10.2019

Термін дії декларації до: 31.10.2024

Директор



к.м.н. І.В. Ніколаєнко



1. INTENDED USE

ELISA test-kit «Vitrotest Anti-Ascaris» is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG antibodies to *Ascaris lumbricoides* in human serum or plasma. The test-kit might be applied for the ELISA using both automatic pipettes and standard equipment as well as open system automated ELISA analyzers.

2. CLINICAL VALUE

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

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

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

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

«Vitrotest Anti-Ascaris» ELISA is a solid phase, indirect ELISA method for detection of IgG antibodies to *Ascaris lumbricoides* in a two-step incubation procedure. Microwells are coated with *A. lumbricoides* antigens. During the first incubation step, the specific antibodies to *A. lumbricoides*, if present, will be bound to the solid phase precoated antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies, leaving only the specific antigen-antibody complexes. Secondary antibodies (anti-IgG) which are conjugated to horseradish peroxidase (HRP) added next and bind to the immune complexes on the solid phase. Unbound components are removed by washing. Chromogen solution containing 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added. TMB is catalysed by the HRP to produce a blue colour product that changes to yellow after adding stop solution. Absorbance at 450/620-695nm is read using a plate reader. The density of yellow colouration is directly proportional to the amount of the antibodies present in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

ELISA STRIPS	1x96 wells	Microplate (12 strips x 8 wells) Each well is coated with <i>A. lumbricoides</i> antigens. The wells can be separated.
CONTROL +	1x0.3 ml	Positive control Solution of specific antibodies to <i>A. lumbricoides</i> with preservative (pink).
CONTROL -	1x0.5 ml	Negative control Negative human serum with preservative (yellow).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (brown-green).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG conjugated to HRP with stabilizers and preservative (green).

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

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

4.2. Material required but not provided

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

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

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

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

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

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

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

5.2. Safety

- all reagents included in the kit are intended for in vitro diagnostic use only;
- the test-kit is designed for use by qualified personnel only;
- disposable gloves and safety glasses must be worn at all times while performing analysis;
- never eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory;
- never pipette solutions by mouth;
- positive control does not contain of human origin components;
- negative control of test-kit «Vitrotest Anti-Ascaris» was tested and found negative for anti-HIV1/2, anti-HCV, anti-T.pallidum antibodies and HBsAg. Nevertheless, all controls and patient samples should be regarded and handled as potentially infectious;
- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at 121°C for 1 hour;
- dispose of inactivated waste in accordance of national laws and regulations;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- some components of the test-kit contain low concentrations of harmful compounds and could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact of TMB SOLUTION, STOP SOLUTION or CONJUGATE SOLUTION with skin or mucosa, the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;
- in case of spilling of solutions that do not contain acid, e.g. sera, rinse the surface with disinfectant, then dry it with absorbent paper. In other case acid first must be neutralized by sodium bicarbonate and then wiped out as described above.

6. STORAGE AND STABILITY

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

7. SPECIMEN COLLECTION

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

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. [ELISA STRIPS] preparation

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

8.2. Washing solution preparation

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

9. ASSAY PROCEDURE

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

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

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

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

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

10.2. Validation of the test

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

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

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

10.3. Interpretation of results

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

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

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

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

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

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

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

Inter assay reproducibility

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

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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

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

13. TROUBLESHOOTING

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

13. REFERENCE

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

SYMBOLS

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

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

Edition 1st, 12.09.2019.

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



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
tel.: +38(044)222-76-72,
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest Sp. z O.O.
Grunwaldzka Al. 472, Gdansk, 80-309, Poland
tel.: +48-88-2950379, e-mail: info@vitrotest.pl



ASSAY PROCEDURE



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



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



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



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



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



Add 100µl of [CONJUGATE SOLUTION] into the wells
(green colour)



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



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



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



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



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



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

CALCULATION

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

INTERPRETATION

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

1. INTENDED USE

ELISA test-kit «Vitrotest Anti-Lamblia» is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Giardia lamblia* (intestinalis) in human serum or plasma. The test-kit might be applied for the ELISA using both automatic pipettes and standard equipment as well as open system automated ELISA analyzers.

2. CLINICAL VALUE

Giardiasis is a parasitic infestation caused by *Giardia lamblia* (*Giardia intestinalis*) that occurs in latent and manifest forms and causes dysfunction of the intestine. Human giardiasis has been reported from all five continents and most countries in the world. The prevalence rate of infection vary between <1 and 50 % and occurs mainly in developing regions where basic sanitation is lacking, *Giardia* infections are almost universal by the age of two years. On the contrary, in developed countries the prevalence of giardiasis is only 3–7% and the disease is distributed among all age groups but mainly among pre-school children.

The main route of transmission is faecal/oral with giardia having a simple, two-stage life-cycle. After the host ingests cysts the trophozoites emerge from the cysts in the duodenum and attach themselves to the small intestinal mucosa. Since trophozoites can only localize onto the duodenal mucosa they mechanically block the mucous membrane and disturb the digestion and motor activity of the small intestine. Giardias cause absorption deterioration of fat, carbohydrates, vitamins C and B12 and secondary bacterial infection. Symptoms of giardiasis include: diarrhea, fatigue, edema, lethargy, weight loss, decreased appetite, paleness, and muscle twitching. Gastro-intestinal giardiasis manifests mainly in the form of enterocolitis with catarrhal symptoms.

Multiple facts suggest the involvement of humoral immune responses in elimination of *G.lamblia*. The human experimental infection model showed that the level of IgM was increased significantly from 14-21 days after infection and that the levels tended to fall after therapy. However, the levels of IgG remained elevated after successful treatment and that IgA response was more similar to that of IgM.

The diagnosis of giardiasis is traditionally based upon clinical history, symptoms, presence of cysts in faeces or trophozoites in material retrieved from the small intestine by duodenal aspiration or duodenal biopsy. Alternative methods to the routine microscopic examination are detection of *G.lamblia* antigen in faeces and the measurement of levels of specific anti-Giardia antibodies in patients' serum. Serologic testing is now regarded as a useful complement in the diagnosis of giardiasis. Besides contributing to the aid of clinical diagnosis, it could help in the understanding of the status of immune responses for each individual and for epidemiological purposes.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

«Vitrotest Anti-Lamblia» ELISA is a solid phase, indirect ELISA method for detection of antibodies to *Giardia lamblia* (intestinalis) in a two step incubation procedure. Microwells are coated with purified antigens of *G.lamblia*. During the first incubation step, the specific antibodies to *G.lamblia*, if present, will be bound to the solid phase precoated antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies, leaving only the specific antigen-antibody complexes. Secondary antibodies (anti-IgG, anti-IgA and anti-IgM) which are conjugated to horseradish peroxidase (HRP) added next and bind to the immune complexes on the solid phase. Chromogen solutions containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide are added. TMB is catalysed by the HRP to produce a blue colour product that changes to yellow after adding stop solution. Absorbance at 450/620-695 nm is read using a plate reader. The density of yellow colouration is directly proportional to the amount of the antibodies present in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

ELISA STRIPS	1x96 wells	Microplate (12 strips x 8 wells) Each well is coated with purified <i>G. lamblia</i> antigens. The wells can be separated.
CONTROL +	1x0.3 ml	Positive control Solution of human specific antibodies to <i>G. lamblia</i> and preservative (pink).
CONTROL -	1x0.5 ml	Negative control Negative human serum and preservative (yellow).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (violet).

CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Conjugate solution (ready to use) Monoclonal antibodies to human IgG, IgA and IgM conjugated to HRP, buffer, stabilizers and preservative (green).
TMB SOLUTION	1x12 ml	TMB solution (ready to use) TMB, H ₂ O ₂ , stabilizers and preservative (colourless).
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Washing solution Tw20 (20x concentrated) 20X concentrate of PBS buffer with Tween-20 and NaCl (colourless)
STOP SOLUTION	1x12 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 M H ₂ SO ₄ (colourless).

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

4.2. Material required but not provided

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

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

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

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

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

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

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

5.2. Safety

- all reagents included in the kit are intended for in vitro diagnostic use only;
- the test-kit is designed for use by qualified personnel only;
- disposable gloves and safety glasses must be worn at all times while performing analysis;
- never eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory;
- never pipette solutions by mouth;
- positive control does not contain of human origin components;
- negative control of test-kit «Vitrotest Anti-Lamblia» was tested and found negative for anti-HIV1/2, anti-HCV, anti-T.pallidum antibodies and HBsAg. Nevertheless, all controls and patient samples should be regarded and handled as potentially infectious;
- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at 121°C for 1 hour;
- dispose of inactivated waste in accordance of national laws and regulations;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- some components of the test-kit contain low concentrations of harmful compounds and

could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact of [TMB SOLUTION] [STOP SOLUTION] or [CONJUGATE SOLUTION] with skin or mucosa, the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;

- in case of spilling of solutions that do not contain acid, e.g. sera, rinse the surface with disinfectant, then dry it with absorbent paper. In other case acid first must be neutralized by sodium bicarbonate and then wiped out as described above.

6. STORAGE AND STABILITY

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

7. SPECIMEN COLLECTION

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

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. [ELISA STRIPS] preparation

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

8.2. Washing solution preparation

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

9. ASSAY PROCEDURE

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

- 9.12. Dispense 100 µl [STOP SOLUTION] into all wells in the same order and at the same rate as for [TMB SOLUTION].
- 9.13. Read the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm using a microplate reader within 5 minutes after adding the [STOP SOLUTION]. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and absence of bubbles in the wells before reading.
- Measurement in the single-wave procedure at 450 nm is possible. Reserve blank well to adjust spectrophotometer in such analysis. Only [TMB SOLUTION] and [STOP SOLUTION] must be added in blank well).*

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

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

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = Nc + 0.25; \quad IP_{sample} = OD_{sample}/CO$$

10.2. Validation of the test

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

[CONTROL] +	OD ≥ 1.200
[CONTROL] −	OD ≤ 0.150
[CONTROL] −	$Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$

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

10.3. Interpretation of results

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

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

Relative sensitivity of the «Vitrotest Anti-Lamblia» ELISA kit was 94 % while evaluating it by using of positive 44 sera in other commercial test-kit. In the comparative studies with other commercial test-kit using 231 negative sera specificity of the «Vitrotest Anti-Lamblia» was 97.5 %.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

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

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
38S	0.690	2.29	3.0
37S	1.646	5.47	5.8
17S	2.590	8.49	3.3

Inter assay reproducibility

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

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
38S	0.672	2.28	4.2
37S	1.615	5.47	5.6
17S	2.523	8.56	7.3

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The final diagnosis must not be established only on the basis of the serologic test but should take into account the set of laboratory and instrumental studies as well as clinical manifestations of the disease. For example, it is recommended to consider the determination of cysts in faeces, trophozoites in duodenal secretions or *G.lamblia* antigen in faeces.

It is impossible to completely eliminate cross-reactions antibodies and antigens of other parasites. Anti-*G.lamblia* antibodies are often not detectable in children with persistent and prolonged giardiasis.

Anti-*G.lamblia* IgG antibodies can be detectable in ELISA for a long time even after successful treatment.

13. TROUBLESHOOTING

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

13. REFERENCE

1. Adam R.D. Biology of *Giardia lamblia*. // Clin. Microbiol. Rev. - 2001. - 14. –P. 447–475.
2. Ahmed M.M., Bolbol A.H. The intestinal parasitic infections among children in Riyadh, Saudi Arabia // J. Egypt. Soc. Parasitol. – 1989. – 19. P. 583-588.
3. Nash T.E., Herrington D.A., Losonsky G.A., Levine M.M. Experimental human Infections with *Giardia lamblia* // J.Infect. Dis. – 1987. – 156. P. 974-983.
4. Flanagan P.A. *Giardia* - diagnosis, clinical course and epidemiology // Epidemiol. Infect. – 1992. – 109. P. 1-22.
5. Roxström-Lindquist K., Palm D., Reiner D., Ringqvist E., Svärd S.G. *Giardia* immunity – an update // Trends Parasitol. – 2006. – 22. –P. 26-31.
6. Sullivan P.B., Neale G, Cevallos A.M., Farthing M.J.G. Evaluation of specific serum anti-*Giardia* IgM antibody response in diagnosis of giardiasis in children // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1991. -Vol. 85, Issue 6. – P.748-749.

SYMBOLS

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

TY Y 24.4-36555928-001:2011
Inst_Anti-Lambliia_TK030_V01

Edition 1st, 12.09.2019.

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



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
tel.: +38(044)222-76-72,
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest Sp. z O.O.
Grunwaldzka Al. 472, Gdansk, 80-309, Poland
tel.: +48-88-2950379, e-mail: info@vitrotest.pl



ASSAY PROCEDURE



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



Dispense 90µl of [SAMPLE DILUENT] into the wells
(violet)



Dispense 10µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL +],
B1, C1, D1 – [CONTROL -],
E1 and other wells – patient samples
(colour changes from violet to blue)



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



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



Add 100µl of [CONJUGATE SOLUTION] into the wells
(green colour)



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



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



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



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



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



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

CALCULATION

$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3$;
 $CO = Nc + 0.25$;
 $IP_{sample} = OD_{sample} / CO$;
 $Nc - OD_{mean}$ for 3 [CONTROL -]
CO - Cut off, IP- Index of Positivity

INTERPRETATION

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

1. INTENDED USE

ELISA test-kit «Vitrotest Anti-Toxocara» is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Toxocara canis* in human serum or plasma. The test-kit might be applied for the ELISA using both automatic pipettes and standard equipment as well as open system automated ELISA analyzers.

2. CLINICAL VALUE

Toxocariasis is a zoonotic disease caused by the parasitizing of larvae of roundworms belonging to the genus *Toxocara* in humans which can cause damage to eyes and internal organs. The disease is widespread in all countries and often affects children. Several species of this genus are known, and many studies have shown the role of *Toxocara canis* (worms affecting mainly dogs) and to a lesser extent *Toxocara cati* (affecting mainly cats) in a human disease.

The sources of human infestation are mainly dogs which contaminate the soil with eggs of *Toxocara* from excreted faeces. The rate of dog infection with this helminth is about 15-50%, but in some areas it reaches 90%. Since mature forms are not formed in the human body infected people cannot be the source of *Toxocara*.

Humans are infected with toxocarar by ingesting the eggs with food or water contaminated with animal faeces, as well as by direct contact with infected animals. Larvae emerging from eggs migrate through the intestinal wall into the bloodstream and enter various organs and tissues where they encapsulate and maintain long-term biological activity which causes the larval form of the disease. While migrating within the human body the larvae injure tissues causing necrosis and inflammatory processes.

Clinical symptoms of toxocariasis depend on the location and intensity of the parasite invasion. Clinical discourse of the disease cites two forms of invasion which are distinguishable, firstly, visceral syndrome of "migrating larvae" (visceral larva migrans) and secondly ocular toxocariasis (ocular larva migrans). Visceral toxocariasis manifests as a recurrent fever lasting for several weeks or even months. Enlargement of individual lymph nodes and diseases effecting the respiratory system such as bronchitis and pneumonia may also occur. In almost all cases toxocariasis is characterized by eosinophilia.

The intravital parasitological diagnosis of toxocariasis is almost impossible to discover due to the difficulty of detection of the migrating larvae and histological studies (biopsies) are only useful in some cases. Numerous studies have shown that serological testing, including ELISA, using purified antigens of larvae is a sensitive and specific diagnostic method. To date it is possible to detect specific antibodies for excretory-secretory and somatic antigens of the *T. canis* larvae.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

«Vitrotest Anti-Toxocara» ELISA is a solid phase, indirect ELISA method for detection of antibodies to *Toxocara canis* in a two step incubation procedure. Microwells are coated with *T. canis* larva antigens. During the first incubation step, the specific antibodies to *T. canis*, if present, will be bound to the solid phase precoated antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies, leaving only the specific antigen-antibody complexes. A secondary antibody (anti-IgG) which is conjugated to horseradish peroxidase (HRP) added next and binds to the immune complexes on the solid phase. Unbound components are removed by washing. Chromogen solution containing 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added. TMB is catalysed by the HRP to produce a blue colour product that changes to yellow after adding stop solution. Absorbance at 450/620-695 nm is read using a plate reader. The density of yellow colouration is directly proportional to the amount of the antibodies present in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

ELISA STRIPS	1x96 wells	Microplate (12 strips x 8 wells) Each well is coated with <i>T. canis</i> larva antigens. The wells can be separated.
CONTROL +	1x0.3 ml	Positive control Solution of human specific antibodies to <i>T. canis</i> and preservative (pink).
CONTROL -	1x0.5 ml	Negative control Negative human serum and preservative (yellow).

SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (brown-green).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Conjugate solution (ready to use) Monoclonal antibodies to human IgG conjugated to HRP, buffer, stabilizers and preservative (green).
TMB SOLUTION	1x12 ml	TMB solution (ready to use) TMB, H ₂ O ₂ , stabilizers and preservative (colourless).
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Washing solution Tw20 (20x concentrated) 20X concentrate of PBS buffer with Tween-20 and NaCl (colourless)
STOP SOLUTION	1x12 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 M H ₂ SO ₄ (colourless).

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

4.2. Material required but not provided

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

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

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

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

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

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

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

5.2. Safety

- all reagents included in the kit are intended for in vitro diagnostic use only;
- the test-kit is designed for use by qualified personnel only;
- disposable gloves and safety glasses must be worn at all times while performing analysis;
- never eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory;
- never pipette solutions by mouth;
- positive control does not contain of human origin components;
- negative control of test-kit «Vitrotest Anti-Toxocara» was tested and found negative for anti-HIV1/2, anti-HCV, anti-T.pallidum antibodies and HBsAg. Nevertheless, all controls and patient samples should be regarded and handled as potentially infectious;
- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at 121°C for 1 hour;

- dispose of inactivated waste in accordance of national laws and regulations;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- some components of the test-kit contain low concentrations of harmful compounds and could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact of TMB SOLUTION STOP SOLUTION or CONJUGATE SOLUTION with skin or mucosa, the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;
- in case of spilling of solutions that do not contain acid, e.g. sera, rinse the surface with disinfectant, then dry it with absorbent paper. In other case acid first must be neutralized by sodium bicarbonate and then wiped out as described above.

6. STORAGE AND STABILITY

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

7. SPECIMEN COLLECTION

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

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. ELISA STRIPS preparation

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

8.2. Washing solution preparation

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

9. ASSAY PROCEDURE

- Take out from the protective bag the support frame and the necessary number of the wells (the number of specimens + 4 for controls). Place the wells into the frame. Wells with the controls must be included in every test.
- Complete the sera identification plan.
- Prepare washing solution (see 8.2.).
- Dispense 90 µl of SAMPLE DILUENT into each well.
- Dispense 10 µl of controls and patient s amles into the wells in the following order: A1 – CONTROL +, B1, C1 and D1 – CONTROL -, other wells – patient samples. Mix gently to avoid foaming. The colour of the sample diluent changes from brown-green to blue.
- Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
- At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive film and wash the well 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
 - aspirate the contents of all wells into a liquid waste container and add immediately a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well;
 - soak each well for 30 seconds between each wash cycle;
 - aspirate again. The residual volume must be lower than 5 µl.
 - repeat the washing step 4 times;
 - after the final washing cycle, turn down the plate onto an absorbent paper and tap it to remove any residual buffer.
- Dispense 100 µl of CONJUGATE SOLUTION per well. Cover strips with a new adhesive film, incubate for 30 min at 37°C.
- At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive film and wash the wells five times as described above (see 9.7).
- Dispense 100 µl TMB SOLUTION into all wells. Do not touch the walls and bottoms of the wells to avoid contamination.

- 9.11. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark. Do not use adhesive film in this step.
- 9.12. Dispense 100 µl [STOP SOLUTION] into all wells in the same order and at the same rate as for [TMB SOLUTION].
- 9.13. Read the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm using a microplate reader within 5 minutes after adding the [STOP SOLUTION]. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and absence of bubbles in the wells before reading.

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

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

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

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

10.2. Validation of the test

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

[CONTROL] +	OD ≥ 1.200
[CONTROL] -	OD ≤ 0.150
[CONTROL] -	$Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$

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

10.3. Interpretation of results

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

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

Relative sensitivity of the «Vitrotest Anti-Toxocara» ELISA kit was 98 % while evaluating it by using of 97 positive to Toxocara canis antibodies sera in 2 other commercial test-kits.

In the comparative studies with other commercial test-kit using 285 negative sera for antibodies to Toxocara canis specificity of the «Vitrotest Anti-Toxocara» was 97.9 %.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

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

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
21L	0.449	1.36	2.2
31L	1.223	3.71	5.9
58L	0.605	1.83	4.7

Inter assay reproducibility

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

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
76L	1.118	3.26	4.42
78L	1.540	4.49	3.70
79L	0.484	1.41	5.43

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

Indeterminate results might indicate the invasion of *Toxocara canis* in anamnesis.

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

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

13. TROUBLESHOOTING

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

REFERENCE

1. Brunello F, Falagiani P, Genchi C. Enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of specific IgG antibodies to *Toxocara canis* ES antigens. // *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* – 1986 – V.65 N.1 – p.54-60.
2. Carlier Y., Yang J., Bout D. and Capron A. The use of an excretory-secretory antigen for an ELISA specific sero-diagnosis of visceral larva migrans. // *Biomed Pharmacother* – 1982. – V.36 N.1 – p.39-42.
3. Jacoquier P., Gottstein B., Stingelin Y. and Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. // *J. Clin. Microbiol.* - 1991. – V. 29 N.9 – p.1831–1835.
4. Magnaval J.F., Glickman L.T., Dorchies Ph., Morassin B. Highlights of human toxocariasis. // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V 39, N.8 – P. 2991-2994.
5. Noordin R., Smith H.V., Mohamad S., et. al. Comparision of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. // *Acta Tropica.* – 2005 - V. 93 – P. 57-62.

SYMBOLS

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

ТУ У 24.4-36555928-001:2011
Inst_Anti-Toxocara_TK058_V01

Edition 1st, 12.09.2019.

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



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
tel.: +38(044)222-76-72,
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest Sp. z O.O.
Grunwaldzka Al. 472, Gdansk, 80-309, Poland
tel.: +48-88-2950379, e-mail: info@vitrotest.pl



ASSAY PROCEDURE



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



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



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



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



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



Add 100µl of [CONJUGATE SOLUTION] into the wells
(green colour)



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



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



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



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



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



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

CALCULATION

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

INTERPRETATION

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

Vitrotest® EBV VCA-IgG

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр (VCA).

TK053

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest EBV VCA-IgG» предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к капсидному антигену (VCA) вируса Эпштейна-Барр в сыворотке или плазме крови человека.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), также известный, как вирус герпеса человека 4-го типа, является этиологическим агентом таких заболеваний, как инфекционный мононуклеоз (ИМ), лимфома Беркитта (ЛБ), назофарингеальная карцинома.

Заражение ВЭБ в раннем детстве является преимущественно бессимптомным. Инфицирование в подростковом или раннем взрослом периоде часто влечет клинический ИМ. В типичном случае болезнь проявляется как фарингит, лимфаденопатия и лихорадка. В большинстве случаев симптомы исчезают через 2-4 недели, однако, у более 90% взрослых развивается латентная инфекция в В-лимфоцитах. Примерно у 1% иммунокомпетентных индивидов могут возникать тяжелые осложнения (гепатит, миокардит, разрыв селезенки, неврологические осложнения). В иммуносупрессированных лиц первичная ВЭБ инфекция приводит к тяжелым расстройствам (например, ЛБ).

Для лабораторной диагностики ВЭБ-инфекции применяют полимеразную цепную реакцию и серологические методы исследований, которые включают тест на выявление гетерофильных антител и определение специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Последний метод позволяет не только установить факт инфицирования ВЭБ, но и стадию заболевания.

Оптимальная комбинация серологических тестов для диагностики ВЭБ-инфекции включает выявление IgG и IgM антител, специфичных к вирусному капсидному антигену (анти-VCA-IgG, анти-VCA-IgM) и ядерному антигену (анти-EBNA-IgG). Анти-VCA-IgM антитела появляются в организме при ранней инфекции и исчезают в течение 4-12 недель. IgG к VCA выявляются несколько позже (через 2-4 недели после инфицирования), их концентрация достигает максимального уровня также на начальных стадиях заболевания, постепенно снижаясь, однако, эти антитела определяются в течение всей жизни. Если антитела к вирусному капсидному антигену не определяются, то человек является восприимчив к ВЭБ-инфекции.

Анти-EBNA-IgG вырабатываются организмом через 2-4 месяца после появления симптомов, у большинства инфицированных их высокий уровень сохраняется в течение всей жизни. Одновременное обнаружение IgG, специфических к EBNA и VCA, является показателем паст-инфекции.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в тест-системе «Vitrotest EBV VCA-IgG» основывается на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбирован капсидный антиген ВЭБ. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета специфические к VCA антитела связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивиридных анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, который связывается с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбирован рекомбинантный капсидный антиген вируса Эпштейна-Барр. Лунки можно отделять.
--------------	------------	--

CONTROL +	1x0,5 мл	Положительный контроль Раствор специфических иммуноглобулинов с консервантом (розовый).
CONTROL –	1x0,5 мл	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зелёный).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 мл	Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зелёный).
TMB SOLUTION	1x12 мл	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный).
WASH TWEEN 20X	1x50 мл	Раствор для промывания Tw20 (20x концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 мл	Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 М H ₂ SO ₄ (бесцветный).

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

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

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121°C в течение 1 часа;
- утилизацию инактивированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] и [CONJUGATE SOLUTION] на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок [ELISA STRIPS] для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
 - 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
 - 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
 - 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 мкл [SAMPLE DILUENT].
 - 9.5. Внести в лунки по 10 мкл контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL -]. В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с коричневого-зелёного на синий.
 - 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
 - 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
 - 9.8. В лунки внести по 100 мкл [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
 - 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
 - 9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл [TMB SOLUTION] в лунки.
 - 9.11. Инкубировать стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
 - 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл [STOP SOLUTION], придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].
 - 9.13. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратить внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.
- Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).*

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

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

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

Интерпретация результатов определение антител, специфических к антигенам вируса Эпштейна-Барр

Наличие антител к антигенам ВЭБ			Интерпретация результата
анти-VCA-IgM	анти-VCA-IgG	анти-EBNA-IgG	
Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Инкубационный период или отсутствие инфекции
Выявляются	Отсутствуют	Отсутствуют	Вероятно ранняя стадия инфекции*
Отсутствуют	Выявляются	Отсутствуют	Данный серологический профиль может соответствовать паст-инфекции, однако недавняя инфекция не может быть исключена *
Выявляются	Выявляются	Отсутствуют	Острая инфекция
Выявляются	Выявляются	Выявляются	Профиль сложно интерпретировать. Он может отображать позднюю первичную инфекцию или реактивацию, однако нельзя исключить ложноположительный результат выявления IgM
Отсутствуют	Выявляются	Выявляются	Паст-инфекция

* рекомендуется повторное обследование пациента через 2-3 недели

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

В сравнительных исследованиях тест-системы «Vitrotest EBV VCA-IgG» с другой коммерческой тест-системой, имеющей CE маркировку, были проанализированы 162 сыворотки, содержащие антитела класса IgG к капсидного антигену вируса Эпштейна-Барр, и 124 сыворотки, не содержащие серологических маркеров ВЭБ-инфекции. Относительная чувствительность тест-системы «Vitrotest EBV VCA-IgG» составила 99,4%, относительная специфичность - 100%.

11.2. Точность

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

Коэффициент вариации (CV) для 2 сывороток с разным уровнем специфических к EBV VCA антител класса IgG оценивали в 32 повторях на одной серии тест-системы.

№ сыворотки	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
9S	2,525	8,02	3,2
22S	1,009	3,20	3,9

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
9S	2,547	8,07	3,8
22S	1,005	3,18	3,7

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе «Vitrotest EBV VCA-IgG» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфичных к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр, которые продуцируются организмом при ВЭБ-инфекции и остаются на уровне, что определяется в течение всей жизни. Наличие антител этого класса у новорожденных не является доказательством инфицирования вирусом Эпштейна-Барр.

Для корректной диагностики Эпштейна-Барр вирусной инфекции рекомендуется провести исследование на наличие анти-VCA-IgM и анти-EBNA-IgG антител, например, в тест-системах «Vitrotest EBV VCA-IgM» и «Vitrotest EBNA-IgG».

Для постановки диагноза следует учитывать как результаты лабораторных исследований, так и клинические проявления заболевания.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Возбудители вирусных инфекций человека. // Медицинская микробиология. / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 745-822.
2. Возіанова Ж.І. Інфекційні і паразитарні хвороби: В 3 т. – К: Здоров'я, 2001.
3. Hess R.D. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years.// J. Clin.Microbiol. – 2004. – V.42, No.8 – P. 3381-3387.
4. Lennette, E.T. Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections, In E.H. Lennette (ed.), Laboratory Diagnosis of Viral Infections. - Dekker Publishing, New York, 1985. - P.257-271.
5. Lennette, E.T. Epstein-Barr Virus, In P.R. Murray (ed.), Manual of Clinical Microbiology. - ASM Press Publishing, Washington, D.C., 1995. - P.905-910.
6. Sumaya, C.V., Jenson, H.B. Epstein-Barr Virus, In N.R. Rose (ed.), Manual of Clinical Laboratory Immunology. - ASM Press Publishing, Washington, D. C., 1992. - P.568-575.

7. Roubalova, K., Roubal, J., Skopovy, P., et. al. Antibody Responses to Epstein-Barr Antigens in Patients with Chronic Viral Infection. // Journal of Medical Virology. - 1988. - 25(1) - P. 115-122.
8. Khanna R., Burrows S.R., Moss D. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1995. – V. 59. – P. 387-405.
9. Gartner B.C., Hess R. D., Bandt D., Kruse A., Rethwilm A., et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2003. – V. 10. – P. 78–82.
10. UK Standards for Microbiology Investigations. Epstein-Barr Virus Serology. // Virology. - V 26, № 5. - P. 11.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Температурный диапазон
	Обратиться к инструкции по применению		Код партии
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Производитель		Дата изготовления
	Осторожно! Обратиться к инструкции по применению		Не допускать воздействия солнечного света
	Содержимого достаточно для (n-) количества тестов		Уполномоченный представитель в ЕС
	Знак соответствия техническим регламентам		

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_EBV_VCA-IgG_TK053_V03
Редакция 3 от 15.02.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103,
Украина, tel.: +38(044)222-76-72,
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest Europe Sp. z O.O.
ul. Krakowska 139-155, 50-428, Wrocław, Poland
tel.: +48-88-2950379,
e-mail: info@vitrotest.pl, www.vitrotest.pl



Vitrotest® EBV VCA-IgG

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты не менее 30 минут при 18-25°C перед использованием



Внести по 90µl **[SAMPLE DILUENT]** в лунки стрипов
(коричнево-зелёный цвет)



Внести по 10µl контролей и образцов в лунки:

A1 – **[CONTROL +]**,

B1, C1, D1 – **[CONTROL -]**,

E1 и остальные лунки – исследуемые образцы
(цвет меняется с коричневого-зелёного на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 (300µl в лунку)



Внести по 100µl **[CONJUGATE SOLUTION]** в каждую лунку
(зелёный цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 (300µl в лунку)



Внести по 100 µl **[TMB SOLUTION]** в каждую лунку



Инкубировать 30 минут в тёмном месте при 18-25°C



Остановить реакцию внесением по 100µl **[STOP SOLUTION]**
(цвет меняется с синего на жёлтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

Nc - среднее значение ОП 3 **[CONTROL -]**,

CO - граничное значение,

IP_{sample} - индекс позитивности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1.1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$	НЕОПРЕДЕЛЁННЫЙ
$IP_{sample} < 0.9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Vitrotest® EBV VCA-IgM

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр (VCA).

TK052

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest EBV VCA-IgM» предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к капсидному антигену (VCA) вируса Эпштейна-Барр в сыворотке или плазме крови человека.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), также известный, как вирус герпеса человека 4-го типа, является этиологическим агентом таких заболеваний, как инфекционный мононуклеоз (ИМ), лимфома Беркитта (ЛБ), незлокачественная карцинома.

Заражение ВЭБ в раннем детстве является преимущественно бессимптомным. Инфицирование в подростковом или раннем взрослом периоде часто влечет клинический ИМ. В типичном случае болезнь проявляется как фарингит, лимфаденопатия и лихорадка. В большинстве случаев симптомы исчезают через 2-4 недели, однако, у более 90% взрослых развивается латентная инфекция в В-лимфоцитах. Примерно у 1% иммунокомпетентных индивидов могут возникать тяжелые осложнения (гепатит, миокардит, разрыв селезенки, неврологические осложнения). В иммуносупрессированных лиц первичная ВЭБ-инфекция приводит к тяжелым расстройствам (например, ЛБ).

Для лабораторной диагностики ВЭБ-инфекции применяют полимеразную цепную реакцию и серологические методы исследований, которые включают тест на выявление гетерофильных антител и определение специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Последний метод позволяет не только установить факт инфицирования ВЭБ, но и стадию заболевания.

Оптимальная комбинация серологических тестов для диагностики ВЭБ-инфекции включает выявление IgG и IgM антител, специфичных к вирусному капсидному антигену (анти-VCA-IgG, анти-VCA-IgM) и ядерному антигену (анти-EBNA-IgG). Анти-VCA-IgM антитела появляются в организме при ранней инфекции и исчезают в течение 4-12 недель. IgG к VCA выявляются несколько позже (через 2-4 недели после инфицирования), их концентрация достигает максимального уровня также на начальных стадиях заболевания, постепенно снижаясь, однако, эти антитела определяются в течение всей жизни. Если антитела к вирусному капсидному антигену не определяются, то человек является восприимчив к ВЭБ-инфекции.

Анти-EBNA-IgG вырабатываются организмом через 2-4 месяца после появления симптомов, у большинства инфицированных их высокий уровень сохраняется в течение всей жизни. Одновременное обнаружение IgG, специфических к EBNA и VCA, является показателем паст-инфекции.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в тест-системе «Vitrotest EBV VCA-IgM» основывается на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса IgM человека. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета иммуноглобулины класса IgM связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется конъюгат рекомбинантного капсидного антигена Эпштейна-Барр с пероксидазой хрена, который связывается с анти-VCA специфическими IgM в составе образованных иммунных комплексов на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Значение ОП, полученное для образца, позволяет выявить наличие или отсутствие антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунки	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса IgM человека. Лунки можно отделять.
---	------------	--

CONTROL +	1x0,5 мл	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов с консервантом (розовый)
CONTROL -	1x0,5 мл	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE DILUENT	1x13 мл	Раствор для розведения конъюгата Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый).
CONJUGATE 11X	1x1,3 мл	Конъюгат (11х концентрат) 11-ти кратный концентрат конъюгата рекомбинантного капсидного антигена вируса Эпштейна-Барр с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (синий).
TMB SOLUTION	1x12 мл	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный).
WASH TWEEN 20X	1x50 мл	Раствор для промывания Tw20 (20х концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 мл	Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 M H ₂ SO ₄ (бесцветный).

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для раствора конъюгата и **TMB SOLUTION**.

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

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121°C в течение 1 часа;
- утилизацию инактивированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и раствора конъюгата на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом:

Развести [CONJUGATE|11X] (синий) в чистом флаконе [CONJUGATE DILUENT] (желтый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в зеленый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить в 1мл [CONJUGATE DILUENT] 100 мкл [CONJUGATE|11X]. Раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение суток при условии хранения при 2-8 °C.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок [ELISA STRIPS] для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 мкл [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 10 мкл контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL|+], в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL|-]. В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с фиолетового на синий.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Приготовить раствор конъюгата согласно пункта 8.3 (в рабочем разведении 1:11).
- 9.9. В лунки внести по 100 мкл раствора конъюгата. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
- 9.10. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.11. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.12. Инкубировать стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.13. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл [STOP SOLUTION], придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].
- 9.14. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратит внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	$OD \geq 1.2$
CONTROL -	$OD \leq 0.150$
CONTROL -	$Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

Интерпретация результатов определения антител, специфических к антигенам вируса Эпштейна-Барр

Наличие антител к антигенам ВЭБ			Интерпретация результата
анти-VCA-IgM	анти-VCA-IgG	анти-EBNA-IgG	
Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Инкубационный период или отсутствие инфекции
Выявляются	Отсутствуют	Отсутствуют	Вероятно ранняя стадия инфекции*
Отсутствуют	Выявляются	Отсутствуют	Данный серологический профиль может соответствовать паст-инфекции, однако недавняя инфекция не может быть исключена *
Выявляются	Выявляются	Отсутствуют	Острая инфекция
Выявляются	Выявляются	Выявляются	Профиль сложно интерпретировать. Он может отображать позднюю первичную инфекцию или реактивацию, однако нельзя исключить ложноположительный результат выявления IgM
Отсутствуют	Выявляются	Выявляются	Паст-инфекция

* рекомендуется повторное обследование пациента через 2-3 недели

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

В сравнительных исследованиях тест-системы «Vitrotest EBV VCA-IgM» с другой коммерческой тест-системой, имеющей CE маркировку, были проанализированы 102 сыворотки, содержащие антитела класса IgM к капсидного антигену вируса Эпштейна-Барр, и 124 сыворотки, не содержащие серологических маркеров ВЭБ-инфекции. Относительная чувствительность тест-системы «Vitrotest EBV VCA-IgM» составила 99,0%, относительная специфичность - 99,2%.

11.2. Точность

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

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

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
1100	1,468	4,42	6,9
1843	0,753	2,27	6,0

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)
 Коэффициент вариации (CV) для 2 сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
1100	1,533	4,65	6,4
1843	0,806	2,44	6,1

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе «Vitrotest EBV VCA-IgM» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgM, специфичных к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр. Антитела класса IgM, специфичные к VCA, присутствуют при острой вирусной инфекции Эпштейна-Барр. Не всегда антитела этого класса являются доказательством первичной инфекции, при реактивации также могут синтезироваться специфические антитела класса IgM.

Нельзя полностью исключить перекрестные реакции с антителами класса IgM к цитомегаловирусу, поскольку оба герпесвирусы имеют похожие антигенные детерминанты. Для исключения ложноположительных результатов рекомендуется исследовать серологический профиль в динамике (CMV IgG, CMV IgM, VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG), а также применять методы выявления ДНК вируса в биологическом материале пациента и учитывать клиническую картину заболевания.

Если образец получен через небольшой промежуток времени после инфицирования, то антитела класса IgM могут не определяться. При наличии клинических симптомов необходимо провести повторное тестирование пациента через 2-4 недели.

С осторожностью следует интерпретировать результаты, полученные для пациентов с иммуносупрессией.

Для постановки диагноза следует учитывать как результаты лабораторных исследований, так и клинические проявления заболевания.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Возбудители вирусных инфекций человека. // Медицинская микробиология. / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 745-822.
2. Возіанова Ж.І. Інфекційні і паразитарні хвороби: В 3 т. – К: Здоров'я, 2001.
3. Hess R.D. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years.// J. Clin.Microbiol. – 2004. – V.42, No.8 – P. 3381-3387.
4. Lennette, E.T. Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections, In E.H. Lennette (ed.), Laboratory Diagnosis of Viral Infections. - Dekker Publishing, New York, 1985. - P.257-271.
5. Lennette, E.T. Epstein-Barr Virus, In P.R. Murray (ed.), Manual of Clinical Microbiology. - ASM Press Publishing, Washington, D.C., 1995. - P.905-910.
6. Sumaya, C.V., Jenson, H.B. Epstein-Barr Virus, In N.R. Rose (ed.), Manual of Clinical Laboratory Immunology. - ASM Press Publishing, Washington, D. C., 1992. - P.568-575.
7. Roubalova,K., Roubal, J., Skopovy, P., et. al. Antibody Responses to Epstein-Barr Antigens in Patients with Chronic Viral Infection. // Journal of Medical Virology. - 1988. - 25(1) - P. 115-122.
8. Khanna R., Burrows S.R., Moss D. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1995. – V. 59. – P. 387-405.
9. Gartner B.C., Hess R. D., Bandt D., Kruse A., Rethwilm A., et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2003. – V. 10. – P. 78–82.
10. UK Standards for Microbiology Investigations. Epstein-Barr Virus Serology. // Virology. - V 26, N° 5. - P. 11.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ



Номер по каталогу



Обратитесь к инструкции по применению



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Производитель



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

Содержимого достаточно для (n-) количества тестов



Знак соответствия техническим регламентам



Температурный диапазон



Код партии



Использовать до



Дата изготовления



Не допускать воздействия солнечного света



Уполномоченный представитель в ЕС

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_EBV_VCA-IgM_TK052_V04
Редакция 4 от 17.06.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103, Украина, tel.: +38(097)222-76-72, +38(044)222-76-72, e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest Europe Sp. z O.O.
ul.Krakowska 139-155, 50-428, Wrocław, Poland
tel.: +48-88-2950379,
e-mail: info@vitrotest.pl, www.vitrotest.pl



Vitrotest® EBV VCA-IgM

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты не менее 30 минут при 18-25°C перед использованием



Внести по 90µl **SAMPLE DILUENT** в лунки стрипов (фиолетовый цвет)



Внести по 10µl контролей и образцов в лунки:

A1 – **CONTROL +**,

B1, C1, D1 – **CONTROL -**,

E1 и остальные лунки – исследуемые образцы (цвет меняется с фиолетового на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 (300µl в лунку)



Внести по 100µl раствора конъюгата (в рабочем разведении 1:11) в каждую лунку (зелёный цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 (300µl в лунку)



Внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в каждую лунку



Инкубировать 30 минут в тёмном месте при 18-25°C



Остановить реакцию внесением по 100µl **STOP SOLUTION** (цвет меняется с синего на жёлтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Nc - среднее значение ОП 3 **CONTROL -**;
CO - граничное значение,
IP_{sample} - индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1.1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$	НЕОПРЕДЕЛЁННЫЙ
$IP_{sample} < 0.9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ