



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»

1. INTENDED USE

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

Trichinosis is a helminthiasis caused by a nematode *Trichinella spiralis*. Trichinellas are small, thread-like worms covered with a striped cuticle. The length of a mature male is 1.2-2 mm with a thickness of 0.04-0.05 mm.

Transmission occurs by ingestion of meat containing encapsulated trichinella larvae. During digestion under the action of the gastric juice larvae release from capsules penetrate the submucosal layer of the small intestine, adhere to the mucosa and begin to proliferate. Soon after fertilization of females, the males die and the females start producing larvae, which enter the blood and lymphatic vessels through tissue mucosa, spread throughout the body and settle in striated muscles. Thereafter this capsule is impregnated with calcium salts leading to calcification. The larvae remain viable for many years.

The incubation period of human trichinosis lasts 10-25 days. Trichinosis is characterized by fever, myalgia, facial swelling, skin rash, blood eosinophilia, and in severe cases – by damage to internal organs and central nervous system.

The diagnosis of trichinosis is based on clinical signs, epidemiological history, serological tests (complement fixation tests, the reaction of indirect hemagglutination) and ELISA. The latter method is recommended by OIE for serological diagnosis of trichinosis.

The most specific and successful method to confirm infestation is the detection of IgG antibodies to trichinella antigens in the blood. These antibodies could be determined from 2-3 to 4-6 weeks after the eating of contaminated meat. Specific IgE class antibodies are present in the blood during the acute stage of the disease, however, they are rarely detected due to the short period of their circulation in the bloodstream. During the early stage of invasion, specific antibodies might be still undetectable. Therefore, another sample should be taken in 1-2 weeks to confirm or reject suspected trichinosis. Seroconversion usually occurs 2-5 weeks after infection depending on the infectious dose. Assessment of antibody dynamics is a very informative marker of therapy effectiveness. In cases of ineffective or untimely therapy, specific antibodies are detected for up to 20 years if trichinosis is effectively treated in the first two weeks after infection, antibodies disappear within a year.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

«Vitrotest Anti-Trichinella» ELISA is a solid phase, indirect ELISA method for detection of IgG antibodies to *Trichinella spiralis* in a two-step incubation procedure. Microwells are coated with *T. spiralis* larva antigens. During the first incubation step, the specific antibodies to *T. spiralis*, 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>T. spiralis</i> larva antigens. The wells can be separated.
CONTROL +	1x0.3 ml	Positive control Solution specific antibodies to <i>T. spiralis</i> and 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-Trichinella» 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

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.
2. Complete the sera identification plan.
3. Prepare washing solution (see 8.2.).
4. Dispense 90 µl of **SAMPLE DILUENT** into each well.
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.
6. Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
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.
8. Dispense 100 µl of **CONJUGATE SOLUTION** per well. Cover strips with a new adhesive film, incubate for 30 min at 37°C.
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.).
10. Dispense 100 µl **TMB SOLUTION** into all wells. Do not touch the walls and bottoms of the wells to avoid contamination.
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}),

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

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

In the study of the specificity of the test-kit «Vitrotest Anti-Trichinella» using 316 negative human serum samples confirmed in other commercial test-kit for antibodies to *T. spiralis*, specificity was 100%.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 3 samples with various specific antibody levels in 32-replicate determinations using 1 lot of the test-kit.

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
2K	2.267	7.0	4.9
4K	1.098	3.4	6.3
6K	0.514	1.6	11.9

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, %
2K	2.332	6.66	3.2
4K	1.055	3.01	4.5
6K	0.499	1.42	12.0

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

Indeterminate results might indicate the invasion of *Trichinella spiralis* in anamnesis.

A negative result in the «Vitrotest Anti-Trichinella» test-kit indicates either the absence of IgG antibodies to *Trichinella spiralis* in the sample tested, or that the concentration of specific antibodies is below the detection threshold of the test. Specific antibodies may not be detected during the early clinical manifestations of the invasion. In this case, it is recommended to repeat the test with new samples obtained in 1-2 weeks.

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. It is recommended to verify positive samples with western blot.

13. TROUBLESHOOTING

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

REFERENCE

1. Dupouy-Camet, J. and Bruschi, F. Management and diagnosis of human trichinellosis. In, (Dupouy-Camet, J and Murrell, K.D. eds.), FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis, Rome, - 2007. - p. 37-68.
2. Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, Nockler K, Kapel CM, Gajadhar AA. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of Trichinella infection in animals and man. // Parasite. - 2004. - Mar; 11(1) – p.3-13.
3. Gomes-Morales M.A., Ludovisi A., Amati A., et. al. Validation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. // Clinical and Vaccine Immunology, - 2008. - Vol.15 No.11 - p.1723-1729.
4. Murrell K.D., & Pozio E. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. // International Journal of Parasitology, -2000, - 30 (12-13), - p.1339-49.

Vitrotest® Anti-Trichinella

Иммуноферментная тест-система для выявления антител к *Trichinella spiralis*

TK067

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest Anti-Trichinella» предназначена для выявления антител класса IgG к *Trichinella spiralis* 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

Трихинеллёз - гельминтоз, который вызывается нематодой *Trichinella spiralis*. Трихинеллы - мелкие, почти нитевидные гельминты, покрытые поперечно-полосатой кутикулой.

Заражение происходит при употреблении мяса, содержащего живые инкапсулированные личинки трихинелл. В процессе пищеварения под действием желудочного сока личинки освобождаются из капсул, проникают в подслизистый слой тонкого кишечника, закрепляются на слизистой оболочке, начинают размножаться. После оплодотворения самцы погибают, самки начинают продуцировать личинок, которые из ткани слизистой оболочки кишки попадают в кровеносные и лимфатические сосуды и разносятся по всему организму, осаждаются в поперечно-полосатой мускулатуре. Впоследствии, вокруг личинки формируется соединительнотканная капсула, которая впоследствии импрегнируется солями кальция, что приводит к обызвествлению. Личинки остаются жизнеспособными много лет.

Инкубационный период при трихинеллезе человека продолжается 10-25 дней. Трихинеллез характеризуется лихорадкой, миалгией, отеком лица, кожными высыпаниями, эозинофилией крови, а при тяжелом протекании - поражением внутренних органов и центральной нервной системы.

Диагностика трихинеллеза осуществляется на основе клинической картины, эпидемиологического анамнеза, серологических исследований, таких как: реакция связывания комплемента, реакция непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ. Последний метод рекомендуется Международным Эпизоотическим Бюро для серологической диагностики трихинеллеза.

Наиболее специфичным и успешным методом для подтверждения инвазии является выявление антител класса IgG к антигенам трихинелл в крови, которые могут определяться в диапазоне от 2-3 до 4-6 недель с момента употребления зараженного мяса. Специфические антитела класса IgE присутствуют в крови в острой стадии болезни, однако, редко выявляются, что связано с коротким периодом их циркуляции в кровяном русле. В начале клинических проявлений инвазии специфические антитела могут вообще не проявляться. Поэтому при подозрении на трихинеллез и получении отрицательного результата исследования проводят повторно через одну-две недели. Сероконверсия обычно происходит в течение второй-пятой недели инфицирования и зависит от полученной пациентом инфекционной дозы. Оценка динамики антителообразования является достаточно информативным критерием эффективности проводимой терапии - при неэффективной или отсроченной терапии специфические антитела выявляются годами (до 20 лет), в случае эффективного лечения в первые две недели после инфицирования антитела исчезают в течение года.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфичных к *Trichinella spiralis*, в тест-системе «Vitrotest Anti-Trichinella» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА при двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы антигены личинок *T. spiralis*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета происходит связывание, при условии присутствия в образцах, специфичных к *T. spiralis* антител с антигенами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки вносится раствор хромогена 3,3', 5,5'-тетрамилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. ТМБ окисляется пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода, образуя продукт голубого цвета, который меняется на желтый при добавлении стоп-реагента. Оптическая плотность (ОП) образцов определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Интенсивность желтой окраски прямо пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лункок	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы антигены личинок <i>T. spiralis</i> . Лунки можно отделять.
CONTROL +	1x0.3 мл	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов, специфических к <i>T. spiralis</i> с консервантом (розовый).

CONTROL –	1x0.5 мл	Отрицательный контроль Отрицательная сыворотка крови человека с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зеленый).
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 смешивайте компоненты разных серий, компоненты из тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

*Примечание: допускается использование **WASH TWEEN** 20X, **TMB SOLUTION** 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 используйте только чистую, тщательно вымытую дистиллированной водой посуду;
- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для **CONJUGATE SOLUTION** и **TMB SOLUTION**.

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

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых перчатках и защитных очках;

- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный контроль не содержит компонентов человеческого происхождения;
- отрицательный контроль тест-системы «Vitrotest Anti-Trichinella» протестирован и найден отрицательным на антитела к ВИЧ_{1/2}, ВГС и Treponema pallidum и HBsAg, однако работать с ним и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- 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 автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и **CONJUGATE SOLUTION** на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

Для предупреждения конденсации воды в лунках необходимо открывать 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 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 пункта 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 та D1 – [CONTROL –], в остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора в лунках с коричнево-зеленого 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 раствора 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 5мкл;
 - 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 100мкл [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 ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения необходимо убедиться в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.
- Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

$$CO = N_c + 0.3;$$

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

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

[CONTROL +]	ОП ≥ 1.200
[CONTROL –]	ОП ≤ 0.150
[CONTROL –]	$N_c \times 0.5 \leq N_{cn} \leq N_c \times 2.0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

При исследовании 316 отрицательных на антитела к *Trichinella spiralis* сывороток предварительно проверенных в другом коммерческом наборе, показатель специфичности составил 100%.

11.2. Точность

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

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
2K	2.267	7.0	4.9
4K	1.098	3.4	6.3
6K	0.514	1.6	11.9

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
2K	2.332	6.66	3.2
4K	1.055	3.01	4.5
6K	0.499	1.42	12.0

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе «Vitretest Anti-Trichinella» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфичных к *Trichinella spiralis*. Наличие антител этого класса у новорожденных не является доказательством инвазии *Trichinella spiralis*.

Неопределенные результаты могут свидетельствовать об инвазии *Trichinella spiralis* в анамнезе. В таком случае рекомендуется повторно через одну-две недели получить и проверить образцы сывороток от пациентов с клиническими признаками трихинеллеза.

Отрицательный результат в тест-системе «Vitretest Anti-Trichinella» свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце антител класса IgG, специфичных к *Trichinella spiralis*, или концентрация специфических антител ниже предела чувствительности анализа.

Окончательный диагноз не может быть установлен только на основании результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать результаты комплекса лабораторных и инструментальных исследований, а также клинические проявления заболевания. Нельзя полностью исключить перекрестные реакции с антителами к антигенам других гельминтов. Для исключения ложноположительного результата рекомендуется проводить верификационные исследования положительных образцов методом иммуноблоттинга.

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

Возможные причины	Способы устранения проблем
<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

Высокий фон в отдельных рядах

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

Значение ОП положительного контроля ниже установленной границы

Неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ)	Повторно провести ИФА, обратить внимание на приготовление этих реагентов
Сокращено время инкубации на одном из этапов	Проводить инкубацию согласно инструкции по применению

Интенсивность окрашивания лунок не отвечает полученной ОП

Смещен оптический луч	Проверить корректность работы ридера
-----------------------	--------------------------------------

ЛИТЕРАТУРА

1. Dupouy-Camet, J. and Bruschi, F. Management and diagnosis of human trichinellosis. In, (Dupouy-Camet, J and Murrell, K.D. eds.), FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis, Rome, - 2007. - p. 37-68.
2. Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, Nockler K, Kapel CM, Gajadhar AA. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of Trichinella infection in animals and man. // Parasite. - 2004. - Mar; 11(1) – p.3-13.
3. Gomes-Morales M.A., Ludovisi A., Amati A., et. al. Validation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. // Clinical and Vaccine Immunology, - 2008. - Vol.15 No.11 - p.1723-1729.
4. Murrell K.D., & Pozio E. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. // International Journal of Parasitology, -2000, - 30 (12-13), - p.1339-49.



Catalogue number / Номер по каталогу



Consult instructions for use / Обратитесь к инструкции по применению



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



Manufacturer / Производитель



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



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



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



Temperature limitation / Температурный диапазон



Batch code / Код партии



Use by / Использовать до



Date of manufacture /Дата изготовления



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



Authorized representative in the European Community / Уполномоченный представитель в ЕС

TU У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Anti-Trichinella_TK067_V02

Edition 2st, 10.01.2020. / Редакция 2 от 10.01.2020г.

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

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
 ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103, Украина
 tel.: +38(044)222-76-72,
 e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua
 Vitrotest Sp. z O.O.
 Grunwaldzka Al. 472, Gdansk, 80-309, Poland
 tel.: +48-88-2950379, e-mail: info@vitrotest.pl



Vitrotest® Anti-Trichinella

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 in the dark at 18-25°C



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



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

CALCULATION

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

$Nc - OD_{mean}$ 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