



EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114
03150 Kyiv, Ukraine
Tel. 0-800-31-89-87
e-mail: info@equitest.com.ua
www.equitest.com.ua

STATEMENT

We, EKVITESTLAB LLC, having a registered office at Velyka Vasylkivska street 114, Kyiv, 03150, Ukraine assign SRL SANMEDICO having a registered office at A. Corobceanu street 7A, apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative in correspondence with the conditions of directive 98/79/EEC.

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

Date: 03 January 2024

Signature: 
Director, Anna Yurchuk



Declaration of Conformity

According to annex III of the Council Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device
We,

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150, tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

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

Declare under our sole responsibility that the following in vitro diagnostic medical devices
other than those covered by annex II and devices for performance evaluation

**EQUI anti-Lambliia - ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to
Giardia lamblia (intestinalis), REF EI-606**

Meet the provisions of the Council Directive 98/79/EC concerning medical devices which
apply to them.

Undersigned declares to fulfill the obligations imposed by Annex III section 2 to 5:

- availability of the technical documentation set in Annex III (section 3), allowing the assessment of conformity of the product with the requirements of the Directive.
- the manufacturer shall take necessary measures to ensure that the manufacturing process follows the principles of quality assurance as appropriate for the products manufactured (Annex III section 4).
- the manufacturer shall institute and keep up to date a systematic procedure to review experience gained from devices in the post-production phase and to implement appropriate means to apply any necessary corrective actions (Annex III section 5).

Conformity assessment was performed according to Article 9 (7) and Annex III, section 3.

Our current Quality System is formatted to international standards:

- **ISO 13485:2016 «Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes»**

Corporate Contact Information

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasytkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

e-mail: info@equitest.com.ua

RESPONSIBLE PERSON'S name: Anna Yurchuk

Position: Director

SIGNATURE :



Date : October 25, 2021

Stamp



European Authorized Representative:

Registered Address:

Obelis s.a.

Bd. Général Wahis 53

B-1030 Brussels, Belgium

Phone: 32.2.732.59.54

Fax: 32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

Representative: Mr. Gideon ELKAYAM (CEO)



Declaration of Conformity

According to annex III of the Council Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device
We,

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150, tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: www.equitest.com.ua

Declare under our sole responsibility that the following in vitro diagnostic medical devices
other than those covered by annex II and devices for performance evaluation

**EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG - ELISA kit for the qualitative detection of IgG
antibodies to *Ascaris lumbricoides*, REF EI-601**

Meet the provisions of the Council Directive 98/79/EC concerning medical devices which
apply to them.

Undersigned declares to fulfill the obligations imposed by Annex III section 2 to 5:

- availability of the technical documentation set in Annex III (section 3), allowing the assessment of conformity of the product with the requirements of the Directive.
- the manufacturer shall take necessary measures to ensure that the manufacturing process follows the principles of quality assurance as appropriate for the products manufactured (Annex III section 4).
- the manufacturer shall institute and keep up to date a systematic procedure to review experience gained from devices in the post-production phase and to implement appropriate means to apply any necessary corrective actions (Annex III section 5).

Conformity assessment was performed according to Article 9 (7) and Annex III, section 3.

Our current Quality System is formatted to international standards:

- **ISO 13485:2016 «Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes»**

Corporate Contact Information

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasytkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

e-mail: info@equitest.com.ua

RESPONSIBLE PERSON'S name: Anna Yurchuk

Position: Director

SIGNATURE :



Date : October 25, 2021

Stamp



European Authorized Representative:

Registered Address:

Obelis s.a.

Bd. Général Wahis 53

B-1030 Brussels, Belgium

Phone: 32.2.732.59.54

Fax: 32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

Representative: Mr. Gideon ELKAYAM (CEO)



Declaration of Conformity

According to annex III of the Council Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device
We,

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150, tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

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

Declare under our sole responsibility that the following in vitro diagnostic medical devices
other than those covered by annex II and devices for performance evaluation

**EQUI *Helicobacter* IgG - ELISA kit for the qualitative and semiquantitative detection
of IgG antibodies to CagA protein of *Helicobacter pylori*, REF EI-502**

Meet the provisions of the Council Directive 98/79/EC concerning medical devices which
apply to them.

Undersigned declares to fulfill the obligations imposed by Annex III section 2 to 5:

- availability of the technical documentation set in Annex III (section 3), allowing the assessment of conformity of the product with the requirements of the Directive.
- the manufacturer shall take necessary measures to ensure that the manufacturing process follows the principles of quality assurance as appropriate for the products manufactured (Annex III section 4).
- the manufacturer shall institute and keep up to date a systematic procedure to review experience gained from devices in the post-production phase and to implement appropriate means to apply any necessary corrective actions (Annex III section 5).

Conformity assessment was performed according to Article 9 (7) and Annex III, section 3.

Our current Quality System is formatted to international standards:

- **ISO 13485:2016 «Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes»**

Corporate Contact Information

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

e-mail: info@equitest.com.ua

RESPONSIBLE PERSON'S name: Anna Yurchuk

Position: Director

SIGNATURE :



Date : October 25, 2021

Stamp



European Authorized Representative:

Registered Address:

Obelis s.a.

Bd. Général Wahis 53

B-1030 Brussels, Belgium

Phone: 32.2.732.59.54

Fax: 32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

Representative: Mr. Gideon ELKAYAM (CEO)



Declaration of Conformity

According to annex III of the Council Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device
We,

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150, tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: www.equitest.com.ua

Declare under our sole responsibility that the following in vitro diagnostic medical devices
other than those covered by annex II and devices for performance evaluation

**EQUI Toxocara canis IgG - ELISA kit for the qualitative detection of IgG antibodies to
Toxocara canis, REF EI-603**

Meet the provisions of the Council Directive 98/79/EC concerning medical devices which
apply to them.

Undersigned declares to fulfill the obligations imposed by Annex III section 2 to 5:

- availability of the technical documentation set in Annex III (section 3), allowing the assessment of conformity of the product with the requirements of the Directive.
- the manufacturer shall take necessary measures to ensure that the manufacturing process follows the principles of quality assurance as appropriate for the products manufactured (Annex III section 4).
- the manufacturer shall institute and keep up to date a systematic procedure to review experience gained from devices in the post-production phase and to implement appropriate means to apply any necessary corrective actions (Annex III section 5).

Conformity assessment was performed according to Article 9 (7) and Annex III, section 3.

Our current Quality System is formatted to international standards:

- **ISO 13485:2016 «Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes»**

Corporate Contact Information

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

e-mail: info@equitest.com.ua

RESPONSIBLE PERSON'S name: Anna Yurchuk

Position: Director

SIGNATURE :



Date : October 25, 2021

Stamp



European Authorized Representative:

Registered Address:

Obelis s.a.

Bd. Général Wahis 53

B-1030 Brussels, Belgium

Phone: 32.2.732.59.54

Fax: 32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

Representative: Mr. Gideon ELKAYAM (CEO)



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11- Borrelia-G

Редакція 03

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936

e-mail: equitest@ukr.net, web-site: <https://equitest.com.ua>, тел. (044)222-76-93

адреса виробництва: проспект Перемоги, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: медичні вироби для діагностики *in vitro*

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3002

а саме:

«EQUI Borrelia burgdorferi IgG» – ІФА-набір для якісного та напівкількісного виявлення антитіл класу IgG до *Borrelia burgdorferi*, номер за каталогом EI-801

класифікація: інші (не відносяться до переліку А або В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*, не є виробами для самоконтролю та не для оцінки характеристик)

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*,
затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

Залучення призначеного органу не передбачено

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури з оцінки відповідності наведені в Додатку 3 (без положень п. 6-8) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 вересня 2020 р.

дата випуску

31 серпня 2025 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)

МП

(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11- Borrelia-M

Редакція 03

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936

e-mail: equitest@ukr.net, web-site: <https://equitest.com.ua>, тел. (044)222-76-93

адреса виробництва: проспект Перемоги, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: медичні вироби для діагностики *in vitro*

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3002

а саме:

«EQUI Borrelia burgdorferi IgM» – ІФА-набір для якісного виявлення антитіл класу IgM до *Borrelia burgdorferi*, номер за каталогом EI-802

класифікація: інші (не відносяться до переліку А або В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*, не є виробами для самоконтролю та не для оцінки характеристик)

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

Залучення призначеного органу не передбачено

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури з оцінки відповідності наведені в Додатку 3 (без положень п. 6-8) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 вересня 2020 р.

дата випуску

31 серпня 2025 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)

МП

(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11-Chlam-A

Редакція 05

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: https://equitest.com.ua, тел. (044)334-89-87
адреса виробництва: проспект Берестейський, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: медичні вироби для діагностики *in vitro*

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3822. Код НК 024:2023 – 50773

а саме:

«EQUI Chlamydia trachomatis IgA» – ІФА-набір для якісного та напівкількісного виявлення
антитіл класу IgA до *Chlamydia trachomatis*, номер за каталогом EI-103

класифікація: відносяться до переліку В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*,
затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

ТОВ «УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ СТАНДАРТІВ»

місцезнаходження: будинок 1, вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.

Номер призначеного органу UA.TR.137

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури оцінки відповідності наведеної в Додатку 4: забезпечення функціонування
комплексної системи управління якістю (без перевірки проекту) Технічного регламенту щодо
медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від
02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

сертифікат відповідності № R4M 804 255 B1 (термін дії: з 01.04.2024р. до 31.03.2029р.)

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 квітня 2024 р.

дата випуску

31 березня 2029 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)



(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого
постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11-Chlam-G

Редакція 05

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: https://equitest.com.ua, тел. (044)334-89-87
адреса виробництва: проспект Берестейський, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: **медичні вироби для діагностики *in vitro***

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3822. Код НК 024:2023 – 50768

а саме:

**«EQUI Chlamydia trachomatis IgG» – ІФА-набір для якісного та напівкількісного виявлення
антитіл класу IgG до *Chlamydia trachomatis*, номер за каталогом EI-102**

класифікація: відносяться до переліку В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

**Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*,
затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754**

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

ТОВ «УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ СТАНДАРТІВ»

місцезнаходження: будинок 1, вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.

Номер призначеного органу UA.TR.137

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури оцінки відповідності наведеної в Додатку 4: забезпечення функціонування комплексної системи управління якістю (без перевірки проекту) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

сертифікат відповідності № R4M 804 255 B1 (термін дії: з 01.04.2024р. до 31.03.2029р.)

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 квітня 2024 р.

дата випуску

31 березня 2029 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)



(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11-HBsAg

Редакція 05

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: https://equitest.com.ua, тел. (044)334-89-87
адреса виробництва: проспект Берестейський, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: медичні вироби для діагностики *in vitro*

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3822. Код НК 024:2023 – 48319

а саме:

«EQUI HBsAg» – ІФА-набір для якісного виявлення поверхневого антигена вірусу гепатиту В,
номери за каталогом EI-011 (96 аналізів), EI-012 (192 аналізи)

класифікація: відносяться до переліку А Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*,
затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

ТОВ «УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ СТАНДАРТІВ»

місцезнаходження: будинок 1, вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.

Номер призначеного органу UA.TR.137

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури оцінки відповідності наведеної в пунктах 6 – 8 Додатку 4 Технічного регламенту
щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів
України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

сертифікат відповідності № R4M 804 255 B1 (термін дії: з 01.04.2024р. до 31.03.2029р.)

сертифікат перевірки проекту № D4M 804 255/1 B1 (термін дії: з 01.04.2024р. до 31.03.2029р.)

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 квітня 2024 р.

дата випуску

31 березня 2029 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)



(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого
постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006

**ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»**

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936

e-mail: equitest@ukr.net, web-site: <https://equitest.com.ua>, тел. (044)222-76-93

адреса виробництва: проспект Перемоги, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: **медичні вироби для діагностики *in vitro*****Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3002**

а саме:

«EQUI Helicobacter IgA» – ІФА-набір для якісного та напівкількісного виявлення антитіл класу IgA до білка CagA *Helicobacter pylori*, номер за каталогом EI-503класифікація: інші (не відносяться до переліку А або В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*, не є виробами для самоконтролю та не для оцінки характеристик)

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

Залучення призначеного органу не передбачено

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури з оцінки відповідності наведені в Додатку 3 (без положень п. 6-8) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.**м. Київ**

місце випуску

01 вересня 2020 р.

дата випуску

31 серпня 2025 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)

МП

(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11- HSV1+2-G

Редакція 03

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936

e-mail: equitest@ukr.net, web-site: <https://equitest.com.ua>, тел. (044)222-76-93

адреса виробництва: проспект Перемоги, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: **медичні вироби для діагностики *in vitro***

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3002

а саме:

«EQUI HSV1+2 IgG» – ІФА-набір для якісного та напівкількісного виявлення антитіл класу IgG до вірусу простого герпесу першого та другого типів, номер за каталогом EI-071

класифікація: інші (не відносяться до переліку А або В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*, не є виробами для самоконтролю та не для оцінки характеристик)

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

Залучення призначеного органу не передбачено

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури з оцінки відповідності наведені в Додатку 3 (без положень п. 6-8) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 вересня 2020 р.

дата випуску

31 серпня 2025 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11- HSV1+2-М

Редакція 03

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936

e-mail: equitest@ukr.net, web-site: <https://equitest.com.ua>, тел. (044)222-76-93

адреса виробництва: проспект Перемоги, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: медичні вироби для діагностики *in vitro*

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3002

а саме:

«EQUI HSV1+2 IgM» – ІФА-набір для якісного виявлення антитіл класу IgM до вірусу простого герпесу першого та другого типів, номер за каталогом EI-072

класифікація: інші (не відносяться до переліку А або В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*, не є виробами для самоконтролю та не для оцінки характеристик)

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*,
затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

Залучення призначеного органу не передбачено

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури з оцінки відповідності наведені в Додатку 3 (без положень п. 6-8) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 вересня 2020 р.

дата випуску

31 серпня 2025 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11-ТохопІ-G

Редакція 05

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: https://equitest.com.ua, тел. (044)334-89-87
адреса виробництва: проспект Берестейський, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: медичні вироби для діагностики *in vitro*

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3822. Код НК 024:2023 – 52436

а саме:

«EQUI Toxoplasma gondii IgG» – ІФА-набір для кількісного визначення антитіл класу IgG
до *Toxoplasma gondii*, номер за каталогом EI-041

класифікація: відносяться до переліку В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*,
затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

ТОВ «УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ СТАНДАРТІВ»

місцезнаходження: будинок 1, вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.

Номер призначеного органу UA.TR.137

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури оцінки відповідності наведеної в Додатку 4: забезпечення функціонування комплексної системи управління якістю (без перевірки проекту) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

сертифікат відповідності № R4M 804 255 B1 (термін дії: з 01.04.2024р. до 31.03.2029р.)

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 квітня 2024 р.

дата випуску

31 березня 2029 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)



(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ

Ф-4.2-11-Тохорп-М

Редакція 05

Сторінка 1/1

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна, код ЄДРПОУ 38745936
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: <https://equitest.com.ua>, тел. (044)334-89-87
адреса виробництва: проспект Берестейський, 60/2, м. Київ, 03057, Україна

(найменування, місцезнаходження виробника, код згідно з ЄДРПОУ)

підтверджує, що: **медичні вироби для діагностики *in vitro***

Код ДКПП 21.20.2. Код УКТЗЕД 3822. Код НК 024:2023 – 52440

а саме:

«EQUI Toxoplasma gondii IgM» – ІФА-набір для якісного виявлення антитіл класу IgM до *Toxoplasma gondii*, номер за каталогом EI-043

класифікація: відносяться до переліку В Додатку 2 Технічного регламенту для діагностики *in vitro*

які виготовляються серійно відповідно до затвердженої технічної документації:

ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(найменування виробника)

відповідають вимогам:

Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №754

Додаткова інформація:

Призначений орган з оцінки відповідності:

ТОВ «УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ СТАНДАРТІВ»

місцезнаходження: будинок 1, вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.

Номер призначеного органу UA.TR.137

(найменування, ідентифікаційний номер згідно з реєстром призначених органів)

виконав: процедури оцінки відповідності наведеної в Додатку 4: забезпечення функціонування комплексної системи управління якістю (без перевірки проекту) Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754

(опис виконаних робіт)

та видав сертифікат(-и):

сертифікат відповідності № R4M 804 255 B1 (термін дії: з 01.04.2024р. до 31.03.2029р.)

(№ та термін дії сертифікату відповідності)

Технічна документація на медичний виріб розроблена та зберігається у виробника.

Декларація складена під цілковиту відповідальність виробника.

м. Київ

місце випуску

01 квітня 2024 р.

дата випуску

31 березня 2029 р.

термін дії декларації до

Директор ТОВ «ЕКВІТЕСТЛАБ»

(посада уповноваженої особи)



(підпис)

А.В. Юрчук

(ініціали та прізвище)

Декларація складена у відповідності до вимог Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013р. № 754 та вимог ДСТУ ISO/IEC 17050-1:2006



Сертифікат
Certificate

№ Q1M 804 255 C1



Система управління якістю виробника:
Quality management system of manufacturer

Товариство з обмеженою відповідальністю
«ЕКВІТЕСТЛАБ»
«EKVITESTLAB» Limited Liability Company

Місцезнаходження юридичної особи: вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна
Location of the legal entity: 114 Velyka Vasylkivska St., Kyiv, 03150, Ukraine
Фактичне місцезнаходження: Україна, 03057, м. Київ, проспект Берестейський 60/2
Actual location: 60/2 Beresteysky Avenue, Kyiv, 03057, Ukraine

Відповідає вимогам:
meets the requirements of

ДСТУ EN ISO 13485:2018
Вироби медичні. Системи управління якістю.
Вимоги щодо регулювання
(EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT
Medical devices – Quality management systems –
Requirements for regulatory purposes)

Сфера застосування:
Scope

Проектування, розробка, виробництво, зберігання та реалізація ІФА-наборів
для діагностики in vitro
Design, development, production, storage and sale of ELISA kits for in vitro diagnostics

Сертифікат виданий ТОВ «Український Інститут Стандартів», місцезнаходження: будинок 1,
вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.
Атестат акредитації НААУ від 30 червня 2020 року № 80141.
Certificate is issued by LLC Ukrainian Standards Institution: building 1, Oleksandrivska street, Kyiv, 03062, Ukraine.
Accreditation certificate registered on June 30, 2020 No. 80141

Рішення №: 255-000
Decision No.:

Дійсний з: 01.04.2024
Effective date:

Дата видачі: 01.04.2024
Issue date:

Дійсний до: 31.03.2027
Expiry date:



Наталія СТЕПАНКІВСЬКА
Natalia STEPANKIVSKA

80141
Сертифікація систем
менеджменту

Сертифікат чинний за умови проведення щорічного наглядового аудиту.
Чинність сертифікату необхідно перевірити на офіційному веб-сайті
www.usi.biz.ua або за телефоном: +38-050- 818-7-333
Certificate is valid if the annual surveillance audit has been conducted
The validity of the certificate shall be checked on the official website
www.usi.biz.ua or by tel.: +38-050- 818-7-333



HBsAg

**ИФА-набор для качественного обнаружения
поверхностного антигена вируса гепатита В**

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-011

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI HBsAg

ИФА-набор для качественного обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

STRIPS	1 x 96 лунок	В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела к HBsAg. Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев
---	--------------	---

Позитивный контроль

CONTROL +	1 x 1,6 ml	Раствор поверхностного антигена вируса гепатита В в буфере с альбумином и консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
--	------------	---

Негативный контроль

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

Конъюгат (11х концентрат)

CONJ 11x	1 x 0,8 ml	11-кратный концентрат конъюгата моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый). Развести конъюгат (11х) 1:11 раствором для разведения конъюгата перед использованием (например, 50 µl концентрата + 500 µl раствора для разведения конъюгата, достаточно для 8 лунок). Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 суток
---	------------	--

Раствор для разведения конъюгата

DIL CONJ	1 x 8 ml	Буферный раствор с белками сыворотки крови крупного рогатого скота и иммуноглобулинами мыши с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
---	----------	---

Раствор ТМБ (готов к использованию)

SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
---	-----------	---

Раствор для промывки TWEEN (20х концентрат)

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

Стоп-раствор (готов к использованию)

SOLN STOP	1 x 13 ml	Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
--	-----------	--

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

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

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

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

5.2. Техника безопасности

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

5.3. Инаktivация и утилизация отходов

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

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

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

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка планшета ИФА

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

8.2. Приготовление промывочного раствора

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

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

8.3. Приготовление раствора конъюгата

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

9.2. Заполните схему внесения образцов.

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

9.4. Приготовьте раствор конъюгата согласно пункту 8.3.

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

[CONTROL|+] – в лунку A1,

[CONTROL|-] – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

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

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

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

- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
- наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
- аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;

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

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

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

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,07$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

$$[CONTROL|+] \quad ОП \geq 1,5$$

$$[CONTROL|-] \quad ОП \leq 0,100$$

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

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

10.3. Интерпретация результатов

$OD_{sample} \geq CO$ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

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

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

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

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

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

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

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

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

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

Аналитическая чувствительность

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

Аналитическая специфичность

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

11.2. Диагностические характеристики

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

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

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

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

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

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

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

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

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

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

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

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомиться с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 8 от 21.09.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквитестлаб»

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

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

Внести по 100 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:

A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],

E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы

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

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

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

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

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

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

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

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

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

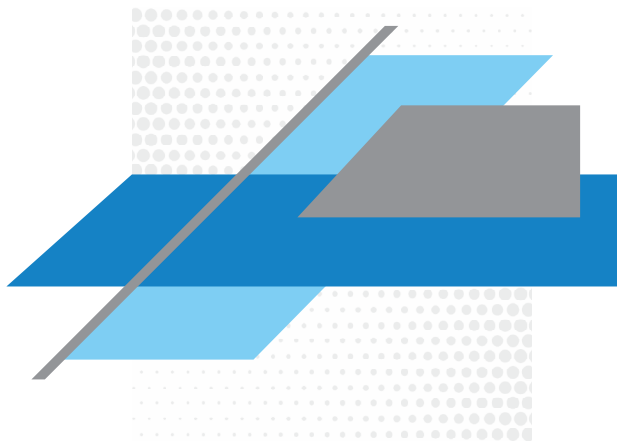
$OD_{sample} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{sample} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



anti-HCV

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

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-021

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI anti-HCV

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

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

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

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

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

Позитивный контроль

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

Негативный контроль

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

Раствор для разведения сывороток

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

Раствор конъюгата (готов к использованию)

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

Раствор ТМБ (готов к использованию)

SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
---------------------	-----------	---

Раствор для промывки TRITON (20x концентрат)

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

Стоп-раствор (готов к использованию)

SOLN STOP	1 x 13 ml	Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
----------------------	-----------	--

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

5.2. Техника безопасности

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

- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- **CONTROL +** ИФА-набора «EQUI anti-HCV» содержит иммуноглобулины человека, специфические к ВГС, которые были выделены с инаktivированным прогреванием сывороток крови человека, в которых не было обнаружено HBsAg и антител к ВП1/2 и *Treponema pallidum*, однако работать с контролем следует как с потенциально инфекционным материалом;
- **CONTROL -** ИФА-набора «EQUI anti-HCV» протестировано и признано отрицательным на HBsAg и антитела к ВП1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и изучаемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании **SOLN|TMB**, **SOLN|STOP** и **SOLN|CONJ** на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, затем вытереть досуха фильтровальной бумагой. В противном случае кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инаktivация и утилизация отходов

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

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

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

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка планшета ИФА

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

8.2. Приготовление промывочного раствора

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

9.2. Заполните схему внесения образцов.

9.3. Приготовьте раствор для промывания согласно пункту 8.2.

9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl [DIL|SAMPLE].

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

[CONTROL|+] – в лунку A1,

[CONTROL|-] – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

При внесении происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий.

Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37°C.

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

- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;

- наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывки, оставьте не менее 30 секунд;

- аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должно составлять не более 5 µl;

- повторите процедуру промывки еще четыре раза;

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

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

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

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

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

9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, соблюдая ту же последовательность, что и при внесении [SOLN|TMB]. При внесении происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором несколько меняется оттенок.

9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения

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

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

$$[CONTROL +] \quad ОП \geq 1,5$$

$$[CONTROL -] \quad ОП \leq 0,100$$

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

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

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

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

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

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

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

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

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

Аналитическая специфичность

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

11.2. Диагностические характеристики

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

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

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

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

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

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

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

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

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

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

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомиться с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 11.10.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»

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

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057

(адрес производства)

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25 °C

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

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

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

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

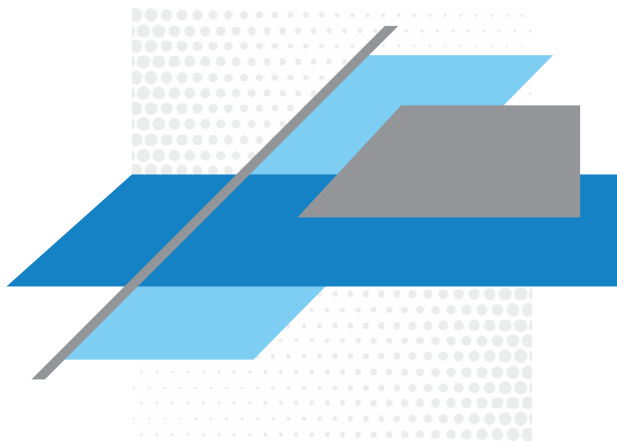
$OD_{sample} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{sample} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Toxoplasma gondii IgG

ИФА-набор для качественного определения
антител класса IgG к *Toxoplasma gondii*

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-041

Σ 96
анализов


UA.TR.130

EQUI *Toxoplasma gondii* IgG

ИФА-набор для количественного определения
антител класса IgG к *Toxoplasma gondii*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «EQUI *Toxoplasma gondii* IgG» предназначен для количественного определения антител класса IgG к *Toxoplasma gondii* в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики токсоплазмоза и оценки иммунного статуса. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора открытого типа.

Целевая группа: женщины детородного возраста, беременные женщины и новорожденные.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Токсоплазмоз – это паразитарное заболевание человека и животных, которое особенно опасно для беременных из-за развития сильных поражений плода. Болезнь вызывают одноклеточные простейшие вида *Toxoplasma gondii*.

T. gondii – это внутриклеточный облигатный паразит, единственный описанный представитель рода *Toxoplasma*. Жизненный цикл токсоплазм является сложным, с чередованием бесполого и полового размножения в разных хозяевах. Токсоплазмоз может быть врожденным и приобретенным, который, в свою очередь, имеет острую и хроническую форму.

Из-за вероятности серьезных последствий для беременных и лиц с ослабленным иммунитетом, при отсутствии четких клинических проявлений заболевания для диагностики токсоплазмоза широко применяются лабораторные методы. Прямая микроскопия мазка, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие методы, позволяющие выявить *T. gondii*, не дают четких представлений о давности инфицирования или стадии заболевания. Для диагностики и дифференциации острого и хронического токсоплазмоза оптимальным является исследование наличия и авидности специфических антител к *T. gondii* методом иммуноферментного анализа.

Специфические антитела класса IgM к *T. gondii* начинают выявляться в крови с пятого дня после инфицирования, их концентрация достигает своего максимума через 1-2 месяца, после чего постепенно снижается. Как правило, через 1-2 года после первого инфицирования антитела IgM к токсоплазмам перестают определяться. Специфические антитела класса IgG появляются на неделю позже специфических IgM и достигают пиковых концентраций через 3-6 месяцев от начала острой инфекции. Более чем двукратный рост титров специфических антител класса IgG за 2-4 недели может указывать

на первичную инфекцию или реактивацию хронического токсоплазмоза. Обычно антитела класса IgG к *T. gondii* обнаруживаются в крови в течение всей жизни и являются индикатором латентного токсоплазмоза. Исследование avidности (родства антител с антигеном) специфических IgG позволяет отличить первичный токсоплазмоз от паст-инфекции. После первого контакта с токсоплазмами антигенами производятся низкоавидные антитела IgG, со временем они заменяются высокоавидными. У больных с иммунодефицитными состояниями низкоавидные антитела могут проявляться в течение нескольких месяцев. У остальных пациентов наличие высокоавидных антител класса IgG к *T. gondii* позволяет исключить острый токсоплазмоз.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgG к *T. gondii* в ИФА-наборе «EQUI Toxoplasma gondii IgG» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы очищенные антигены *T. gondii*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета специфичны к *T. gondii* антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, который связывается с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS	1 x 96 лунок	Планшет ИФА
		В каждой лунке планшета засорбированы очищенные антигены <i>T. gondii</i> . Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев
PREDIL PLATE	1 x 96 лунок	Планшет для предварительного разведения сывороток
CAL 0	1 x 0,25 ml	Калибратор 0
		Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

Калибратор 10

CAL|10

1 x 0,25 ml

Раствор иммуноглобулинов, специфичных к *T. gondii*, в концентрации 10 IU/ml (МЕ/мл) в буфере со стабилизаторами и консервантом (сине-зеленый). Хранить при температуре 2-8°C

Калибратор 50

CAL|50

1 x 0,25 ml

Раствор иммуноглобулинов, специфичных к *T. gondii*, в концентрации 50 IU/ml (МЕ/мл) в буфере со стабилизаторами и консервантом (оранжевый). Хранить при температуре 2-8°C

Калибратор 100

CAL|100

1 x 0,25 ml

Раствор иммуноглобулинов, специфичных к *T. gondii*, в концентрации 100 IU/ml (МЕ/мл) в буфере со стабилизаторами и консервантом (красный). Хранить при температуре 2-8°C

Калибратор 200

CAL|200

1 x 0,25 ml

Раствор иммуноглобулинов, специфичных к *T. gondii*, в концентрации 200 IU/ml (МЕ/мл) в буфере со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор для предварительного разведения сывороток

PREDIL|SAMPLE

1 x 21 ml

Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор для разведения сывороток

DIL|SAMPLE

1 x 13 ml

Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор конъюгата (готов к использованию)

SOLN|CONJ

1 x 13 ml

Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор ТМБ (готов к использованию)

SOLN|TMB

1 x 13 ml

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

Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)

TWEEN|WASH|20x

1 x 50 ml

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

Стоп-раствор (готов к использованию)

SOLN|STOP

1 x 13 ml

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

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

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

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

- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;
- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

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

5.3. Инактивация и утилизация отходов

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

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

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

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка планшета ИФА

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

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите **TWEEN|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для

8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

8.3. Предварительное разведение образцов и калибраторов

Тестируемые образцы и калибраторы предварительно разведите в 10 раз [PREDIL|SAMPLE]. Для этого в необходимое количество лунок (комплектуются в наборе) внесите по 90 µl [PREDIL|SAMPLE] и добавьте по 10 µl образцов и калибраторов. При внесении образцов и калибраторов осторожно пипетируйте смесь, при этом цвет раствора в лунках должен измениться с коричневого на синий. Процедуру разведения образцов и контролей следует проводить непосредственно перед анализом.

Образцы пациентов с ожидаемой концентрацией специфических антител выше [CAL|200] (200 IU/ml (МЕ/мл)) рекомендуем исследовать в двух разведениях 1:100 и 1:1000. Чтобы исследовать образец в разведении 1:1000, приготовьте предварительное разведение образца 1:100, для этого добавьте 10 µl образца к 990 µl [PREDIL|SAMPLE].

Однако встречаются образцы с высоким содержанием специфических к *T. gondii* IgG (выше 1000 IU/ml (МЕ/мл)). Для таких образцов ОП, полученная при исследовании в разведении 1:1000, будет больше оптической плотности [CAL|200]. Поэтому для корректного определения концентрации специфических антител в таких образцах следует исследовать их в конечном разведении 1:3000, а для этого приготовить предварительное разведение этих образцов 1:300. К примеру: 2990 µl [PREDIL|SAMPLE] + 10 µl исследуемого образца.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (пять лунок для калибраторов и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с калибраторами обязательно включайте в каждую постановку анализа.

9.2. Заполните схему внесения образцов.

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

9.4. Приготовьте предварительное разведение образцов и калибраторов, как описано в пункте 8.3.

9.5. Внесите во все лунки планшета по 90 µl [DIL|SAMPLE].

9.6. Внесите в лунки по 10 µl предварительно разведенных 1:10 калибраторов и исследуемых образцов:

[CAL|0] – в лунку A1, [CAL|10] – в лунку B1, [CAL|50] – в лунку C1, [CAL|100] – в лунку D1, [CAL|200] – в лунку E1, в остальные лунки – исследуемые образцы. Таким образом, конечное разведение образцов в лунках должно составлять 1:100. При внесении происходит изменение цвета раствора с желтого на зеленый. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

- 9.7. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.8. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
 - повторите процедуру промывания еще пять раз;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.9. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при 37°C.
- 9.10. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.8.
- 9.11. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.12. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.13. Внесите в лунки стрипов по 100 µl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.
- 9.14. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

[CAL 0]	ОП < 0,120
[CAL 10]	ОП ≥ 0,150
[CAL 50]	ОП ≥ ОП [CAL 10] x 3

CAL 100

ОП ≥ ОПГ CAL 50 x 1,2

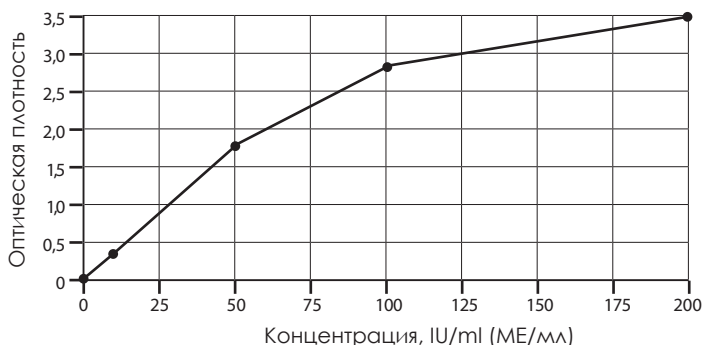
CAL 200

ОП ≥ 2,0

10.2. Учет результатов анализа

Для получения количественных результатов определения концентрации антител класса IgG в IU/ml (МЕ/мл) постройте калибровочную кривую: на оси ОУ отложите полученные значения ОП пяти калибраторов CAL 0, CAL 10, CAL 50, CAL 100 и CAL 200, а на оси ОХ – соответствующие им концентрации – 0, 10, 50, 100, 200 IU/ml (МЕ/мл) соответственно. С помощью калибровочного графика определите концентрацию IU/ml (МЕ/мл) специфических IgG в исследуемых образцах, соответствующую значению полученной ОП.

Пример калибровочного графика приведен на рисунок



Примечание: Не используйте этот график для определения концентрации специфических антител в анализе. Для каждой постановки анализа необходимо строить отдельную калибровочную кривую!

Для образцов, исследовавшихся в разведении 1:1000 и 1:3000, определенную по графику концентрацию специфических антител следует перемножить на степень разбавления, т.е.

конечная концентрация = концентрация по графику × 10 (или × 30)

Для удобства учета результатов реакции можно использовать компьютерные программы считывания и исчисления результатов исследований.

10.3. Интерпретация результатов

Концентрация IgG в образце

Интерпретация

> 10 IU/ml (МЕ/мл)

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

8-10 IU/ml (МЕ/мл)

НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*

< 8 IU/ml (МЕ/мл)

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

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

10.4. Метрологическая прослеживаемость калибраторов

Концентрации калибраторов ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» соответствуют Третьему Международному Стандарту Anti-Toxoplasma serum, Human TOXM (NIBSC, WHO) в диапазоне 10–200 IU/ml (МЕ/мл) (slope = 1,015; $R^2 = 0,978$). Это свидетельствует о метрологической прослеживаемости калибраторов ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» в международно согласованном калибровочном материале (Стандарт TOXM).

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	Концентрация IgG, IU/ml (МЕ/мл)	CV, %
291	1,002	32,7	5,9
292	1,453	48,7	12,9

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	Концентрация IgG, IU/ml (МЕ/мл)	CV, %
291	1,100	30,6	13,1
292	1,317	36,8	11,7

Аналитическая чувствительность

«Граница обнаружения» (LoD) – наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, выявляемому с заявленной вероятностью, для ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» составляет 5,0 IU/ml (МЕ/мл).

«Граница количественного определения» (LoQ) – наименьшая концентрация аналита в образце, определяемая количественно с заявленной приемлемой точностью и правильностью, для ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» составляет 5 IU/ml (МЕ/мл).

«Граница отрицательного значения» (LoB) составляет 0,4 IU/ml (МЕ/мл).

Диапазон линейности

Диапазон линейности ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» находится в пределах 10–160 IU/ml (МЕ/мл). При исследовании образцов сывороток с высокой концентрацией IgG антител к *T. gondii* (более 200 IU/ml (МЕ/мл)) hook-эффект не обнаружен до концентрации 6000 IU/ml (МЕ/мл).

Аналитическая специфичность

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

В результате проведенных исследований не выявлено перекрестных реакций с антителами класса IgG к вирусам краснухи, Эпштейна-Барр, простому герпесу 1 и 2 типа и цитомегаловируса. Также не выявлено влияния на результат анализа ревматоидного фактора в образцах до концентрации 1390 IU/мл (МЕ/мл). Результат анализа, полученный для каждого образца, сравнивали с результатом, полученным в коммерческой тест-системе, имеющей СЕ-маркировку, и рассчитывали относительную специфичность ИФА-наборов «EQUI Toxoplasma gondii IgG».

11.2. Диагностические характеристики

Для определения чувствительности и специфичности ИФА-набора использовали 31 образец сывороток, полученных от пациентов с клиническими симптомами, которые могут наблюдаться при токсоплазмозе и 97 сывороток клинически здоровых пациентов. Чувствительность и специфичность ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» составляли 100%.

Также характеристики метода исследовали на целевой группе беременных женщин (190 образцов) и выборке доноров (287 образцов) по сравнению с аналогичными коммерческими наборами, имеющими СЕ-маркировку. Для выборки беременных женщин относительная чувствительность и специфичность составила 98,9%, процент совпадения – 98,9%. Для выборки доноров относительная чувствительность составила 99,4%, относительная специфичность – 99,0%, процент совпадения – 99,3%. Общая распространенность в популяции составила 57,98%, что полностью соответствует литературным данным.

Позитивная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI Toxoplasma gondii IgG» составляет 100%, отрицательная прогностическая ценность (NPV) – 100%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI Toxoplasma gondii IgG» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфичных к *T. gondii*, которые продуцируются организмом при инфицировании возбудителем токсоплазмоза. Наличие антител этого класса у новорожденных не является подтверждением их инфицирования *T. gondii*. Однократное обнаружение даже высоких титров антител класса IgG нельзя считать доказательством недавнего инфицирования.

Негативный результат в наборе EQUI Toxoplasma gondii IgG показывает, что тестируемый образец не содержит специфических антител или их концентрация ниже уровня чувствительности анализа. Например,

если образец получен через небольшой промежуток времени после инфицирования, то антитела класса IgG могут не обнаруживаться. При наличии клинических симптомов необходимо провести повторное тестирование пациента через 2-4 нед.

Для корректной диагностики активной инфекции следует провести исследование наличия IgG антител в парных образцах, полученных с интервалом забора крови не менее двух недель, а также провести тестирование на наличие специфических антител класса IgM, например, в ИФА-наборе «EQUI *Toxoplasma gondii* IgM». Для дифференциации первичной и паст-инфекции рекомендуется дополнительно провести определение индекса avidности специфических IgG антител (например, в ИФА-наборе «EQUI *Toxoplasma gondii* IgG avidity»).

Окончательный диагноз не может быть установлен только исходя из результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать результаты комплекса лабораторных и инструментальных исследований, а также клинические проявления заболевания.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

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

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

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

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

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Hartmann K., Addie D. et al. *Toxoplasma gondii* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management // *Journal of Feline Medicine and Surgery*. - 2013. - Vol. 15(1). - P.631-637.
2. Hughes J.M., Colley D.G. Preventing congenital toxoplasmosis. // *CDC Recommendations and Reports*. - 2000. - 49 (RR02). – P. 57-75.
3. Flegr J., Prandota J., Sovičková M., Israili Z. H. Toxoplasmosis - a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries // *Public Library of Science ONE*. – 2014. – Vol.9, No.3. – P. e90203.
4. Paquet C., Judin M.H. Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. - 2013. - Vol. 285(1). - P.78-81.
5. Robert-Gangneux, F.; Dardé, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiological Reviews*. – 2012. – Vol.25. – P.264–296.
6. Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis // *Lancet*. – 2004. – Vol.363. – P. 1965–1976.
7. Montoya J.G., Remington J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy.// *Clin Infect Dis*. – 2008. - 47. - P.554–566.
8. Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans // *International Journal for Parasitology*. - 2000. - Vol. 30(12-13). - P.1217-1258.
9. Torgerson P. R., Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review.// *Bulletin of the World Health Organization*. – 2013. – 91. - P. 501-508.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон Украины «Об отходах» // *Российская юстиция*. – 1998. – №36-37.
12. Приказ Минздрава Украины №325 от 08.06.2015 «Об утверждении Государственных санитарно-противоэпидемических правил и норм по обращению с медицинскими отходами».
13. Постановление КМУ от 02 октября 2013г. №754 «Об утверждении технического регламента по медицинским изделиям для диагностики in vitro».
14. ДСТУ EN ISO 17511:2015 - Изделия медицинские для диагностики in vitro Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам (EN ISO 17511:2003, IDT)
15. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
16. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомиться с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 8 от 07.02.2023г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквитестлаб»

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

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки [PREDIL|PLATE] внести по 90 µl [PREDIL|SAMPLE] и по 10 µl исследуемых образцов и калибраторов
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

В лунки [STRIPS] внести по 90 µl [DIL|SAMPLE]
(желтый цвет)

Внести по 10 µl предварительно разбавленных калибраторов и исследуемых образцов:
A1 – [CAL|0], B1 – [CAL|10], C1 – [CAL|50], D1 – [CAL|100], E1 – [CAL|200],
в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с желтого на зеленый)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Построить калибровочную кривую, определить концентрацию IU/ml (МЕ/мл) специфических к *Toxoplasma gondii* антител класса IgG в исследуемых образцах

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

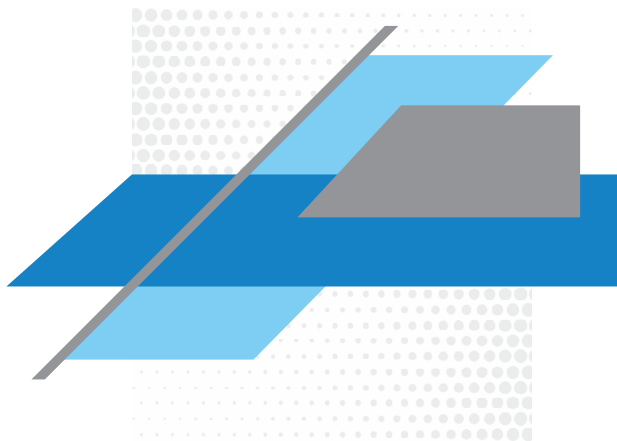
> 10 IU/ml (МЕ/мл)	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
8-10 IU/ml (МЕ/мл)	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
< 8 IU/ml (МЕ/мл)	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Toxoplasma gondii IgM

ИФА-набор для качественного обнаружения
антител класса IgM к *Toxoplasma gondii*

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-043

Σ 96
анализов


UA.TR.130

EQUI *Toxoplasma gondii* IgM

ИФА-набор для качественного обнаружения
антител класса IgM к *Toxoplasma gondii*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «EQUI *Toxoplasma gondii* IgM» предназначен для качественного обнаружения антител класса IgM к *Toxoplasma gondii* в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики острого токсоплазмоза. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: женщины детородного возраста, беременные женщины и новорожденные.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Токсоплазмоз – это паразитарное заболевание человека и животных, которое особенно опасно для беременных из-за развития сильных поражений плода. Болезнь вызывают одноклеточные простейшие вида *Toxoplasma gondii*.

T. gondii – это внутриклеточный облигатный паразит, единственный описанный представитель рода *Toxoplasma*. Жизненный цикл токсоплазмы является сложным, с чередованием бесполого и полового размножения в разных хозяевах. Токсоплазмоз может быть врожденным и приобретенным, который, в свою очередь, имеет острую и хроническую форму.

Из-за вероятности серьезных последствий для беременных и лиц с ослабленным иммунитетом, при отсутствии четких клинических проявлений заболевания для диагностики токсоплазмоза широко применяются лабораторные методы. Прямая микроскопия мазка, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие методы, позволяющие выявить *T. gondii*, не дают четких представлений о давности инфицирования или стадии заболевания. Для диагностики и дифференциации острого и хронического токсоплазмоза оптимальным является исследование наличия и avidности специфических антител к *T. gondii* методом иммуноферментного анализа.

Специфические антитела класса IgM к *T. gondii* начинают выявляться в крови с пятого дня после инфицирования, их концентрация достигает своего максимума через 1-2 месяца, после чего постепенно снижается. Как правило, через 1-2 года после первого инфицирования антитела IgM к токсоплазмам перестают определяться. Специфические антитела класса IgG появляются на неделю позже специфических IgM и достигают пиковых концентраций через 3-6 месяцев от начала острой инфекции. Более чем двукратный рост титров специфических антител класса IgG за 2-4 недели может указывать

на первичную инфекцию или реактивацию хронического токсоплазмоза. Обычно антитела класса IgG к *T. gondii* обнаруживаются в крови в течение всей жизни и являются индикатором латентного токсоплазмоза. Исследование avidности (родства антител с антигеном) специфических IgG позволяет отличить первичный токсоплазмоз от паст-инфекции. После первого контакта с токсоплазмами антигенами производятся низкоавидные антитела IgG, со временем они заменяются высокоавидными. У больных с иммунодефицитными состояниями низкоавидные антитела могут проявляться в течение нескольких месяцев. У остальных пациентов наличие высокоавидных антител класса IgG к *T. gondii* позволяет исключить острый токсоплазмоз.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM к *T. gondii* в ИФА-наборе «EQUI Toxoplasma gondii IgM» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы очищенные антигены *T. gondii*. При первом этапе инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфичны к *T. gondii* антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgM моноклональных антител с пероксидазой хрена, который связывается с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS	1 x 96 лунок	Планшет ИФА В каждой лунке планшета засорбированы очищенные антигены <i>T. gondii</i> . Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев
		Планшет для предварительного разведения сывороток
PREDIL PLATE	1 x 96 лунок	

		Позитивный контроль
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
		Негативный контроль
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
		RF-абсорбент (18x концентрат)
RF-ABSORB 18x	1 x 0,75 ml	18-кратный концентрат моноклональных антител к IgG человека с консервантами (желтый).
		Развести RF-абсорбент (18x) 1:18 раствором для разведения сывороток (например, 50 µl концентрата + 850 µl раствора для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 суток
		Раствор для предварительного разведения сывороток
PREDIL SAMPLE	1 x 21 ml	Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C
		Раствор для разведения сывороток
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
		Раствор конъюгата (готов к использованию)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Буферный раствор моноклональных антител к IgM человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый). Хранить при температуре 2-8°C
		Раствор ТМБ (готов к использованию)
SOLN TMB	1 x 13 ml	Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
		Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 мл концентрата + 95 мл воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток
		Стоп-раствор (готов к использованию)
SOLN STOP	1 x 13 ml	Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

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

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

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

5.2. Техника безопасности

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

5.3. Инактивация и утилизация отходов

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

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

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

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка планшета ИФА

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

8.2. Приготовление промывочного раствора

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

8.3. Предварительное разведение образцов и контролей

Тестируемые образцы и контроли предварительно разведите в 10 раз **PREDIL|SAMPLE**. Для этого в необходимое количество лунок **PREDIL|PLATE** (комплектуются в наборе) внесите по 90 µl **PREDIL|SAMPLE** и добавьте по 10 µl образцов и контролей. При внесении образцов и контролей осторожно пипетируйте смесь, при этом цвет раствора в лунках должен измениться с коричневого на синий. Процедуру разведения образцов и контролей следует проводить непосредственно перед анализом.

8.4. Приготовление раствора RF-абсорбента

В случае наличия в исследуемом образце аутоантитела класса IgM (ревматоидного фактора), они могут связываться с антителами класса IgG к *T.gondii*, образуя иммунные комплексы. Это может привести к ложноположительному результату анализа. Учитывая это, важно заблокировать аутоантител и антител класса IgG абсорбентом ревматоидного фактора (RF-абсорбент). Данная процедура необходима также для предотвращения замещения специфических антител класса IgM антителами класса IgG в составе иммунного комплекса, что может привести к ложноотрицательным результатам.

Для приготовления раствора RF-абсорбента разведите **RF-ABSORB|18x** в чистом флаконе **DIL|SAMPLE** в соотношении 1:18 (1+17), раствор окрашивается в желтый цвет. Например, для 8 лунок анализа (одного стрипа) достаточно добавить в 850 µl **DIL|SAMPLE** 50 µl **RF-ABSORB|18x**. Разбавленный раствор RF-абсорбента можно хранить при температуре 2-8°C не более 1 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контроля и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Приготовьте предварительное разведение образцов и контролей, как описано в пункте 8.3.
- 9.5. Приготовьте раствор RF-абсорбента в соответствии с пунктом 8.4.
- 9.6. Внесите во все лунки планшета по 90 µl RF-абсорбенту.
- 9.7. Внесите в лунки по 10 µl предварительно разведенных 1:10 контролей и исследуемых образцов:

CONTROL|+ – в лунку A1,

CONTROL|- – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

Таким образом, конечное разведение образцов в лунках должно составлять 1:100. При внесении происходит изменение цвета раствора с желтого на зеленый. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

- 9.8. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
 - повторите процедуру промывания еще пять раз;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.10. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при 37°C.
- 9.11. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.9.
- 9.12. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.13. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.14. Внесите в лунки стрипов по 100 µl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.
- 9.15. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

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

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +

ОП $\geq 1,2$

CONTROL -

ОП $\leq 0,150$

CONTROL -

$\bar{Nc} \times 0,5 \leq N_{cp} \leq \bar{Nc} \times 2,0$

де N_{cp} – ОП каждого
повтора Nc

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

Коэффициент вариации (CV) для трех сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 16 повторах на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{sample}	CV, %
114	1,590	4,4	4,2
106	0,713	2,0	7,6
115/2	0,473	1,3	11,2

Воспроизводимость результатов между разными 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 _{sample}	CV, %
114	1,650	4,6	7,8
106	0,693	1,9	8,7
115/2	0,431	1,2	16,1

Аналитическая специфичность

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

По результатам проведенных исследований не выявлено перекрестных реакций с антителами класса IgM к вирусам краснухи, Эпштейна-Барр, простому герпесу 1 и 2 типа и цитомегаловируса. Также не выявлено влияния на результат анализа ревматоидного фактора в образцах до концентрации 1390 IU/мл (ME/мл). Результат анализа, полученный для каждого образца, сравнивали с результатом, полученным в коммерческом ИФА-наборе, имеющем СЕ-маркировку, и рассчитывали относительную специфичность ИФА-наборов «EQUI *Toxoplasma gondii* IgM».

Тип образца	Количество образцов	Относительная специфичность, %
Rubella IgM	4	100
EBV IgM (VCA)	8	100
HSV1+2 IgM	11	100
CMV IgM	10	100
Rf	30	100

11.2. Диагностические характеристики

Для определения чувствительности и специфичности наборов ИФА использовали 33 образца сывороток, полученных от пациентов с клиническими симптомами, которые могут наблюдаться при токсоплазмозе, и 49 образцов сывороток клинически здоровых пациентов (сероотрицательных по отношению к *T. gondii*). Клиническая чувствительность ИФА-наборов «EQUI *Toxoplasma gondii* IgM» составляла 100%, клиническая специфичность – 98%.

Характеристики метода исследовали на целевой группе беременных женщин (190 образцов) и выборке доноров (287 образцов) по сравнению с аналогичными коммерческими наборами, имеющими СЕ-маркировку. Для выборки беременных женщин относительная специфичность ИФА-наборов «EQUI *Toxoplasma gondii* IgM» составила 97,8%, процент совпадения – 97,3%. Для выборки доноров относительная специфичность составила 98,1%, процент совпадения – 97,8%.

Положительная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI *Toxoplasma gondii* IgM» составляет 97,06%, отрицательная прогностическая ценность (NPV) – 100%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI Toxoplasma gondii IgM» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgM, специфичных к *T. gondii*. Анти-*T. gondii* специфические антитела класса IgM являются, как правило, маркерами ранней инфекции. Однако в некоторых случаях специфические к *T. gondii* антитела класса IgM могут проявляться в сыворотке человека в течение длительного времени с момента инфицирования. Для дифференциации первичной и паст-инфекции рекомендуется дополнительно провести исследование образца на наличие антител класса IgG (например, в ИФА-наборе «EQUI Toxoplasma gondii IgG»), а также провести определение индекса авидности специфических IgG антител (например, в ИФА-наборе «EQUI Toxoplasma gondii IgG avidity»).

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

Осторожно следует интерпретировать результаты, полученные для иммуносупрессированных индивидов. Окончательный диагноз не может быть установлен только исходя из результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать результаты комплекса лабораторных и инструментальных исследований, а также клинические проявления заболевания.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

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

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

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

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

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Hartmann K., Addie D. et al. *Toxoplasma gondii* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management // *Journal of Feline Medicine and Surgery*. - 2013. - Vol. 15(1). - P.631-637.
2. Hughes J.M., Colley D.G. Preventing congenital toxoplasmosis. // *CDC Recommendations and Reports*. - 2000. - Vol. 49 (RR02). - P. 57-75.
3. Flegr J., Prandota J., Sovičková M., Israili Z. H. Toxoplasmosis - a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries // *Public Library of Science ONE*. - 2014. - Vol.9, No.3. - P. e90203.
4. Paquet C., Judin M.H. Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. - 2013. - Vol. 285(1). - P.78-81.
5. Robert-Gangneux, F.; Dardé, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiological Reviews*. - 2012. - Vol. 25. - P.264–296.
6. Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis // *Lancet*. - 2004. - Vol. 363. - P. 1965–1976.
7. Montoya J.G., Remington J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy.// *Clin Infect Dis*. - 2008. - Vol. 47. - P.554–566.
8. Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans // *International Journal for Parasitology*. - 2000. - Vol. 30(12-13). - P. 1217-1258.
9. Torgerson P. R., Mastriacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review.// *Bulletin of the World Health Organization*. - 2013. - Vol. 91. - P. 501-508.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон Украины «Об отходах» // *Российская юстиция*. - 1998. - №36-37.
12. Приказ Минздрава Украины №325 от 08.06.2015 «Об утверждении Государственных санитарно-противоэпидемических правил и норм по обращению с медицинскими отходами».
13. Постановление КМУ от 02 октября 2013г. №754 «Об утверждении технического регламента по медицинским изделиям для диагностики in vitro».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002*// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомиться с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 07.02.2023г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквитестлаб»

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

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки [PREDIL|PLATE] внести по 90 µl [PREDIL|SAMPLE] и по 10 µl исследуемых образцов и контролей (происходит изменение цвета с коричневого на синий)

В лунки [STRIPS] внести по 90 µl приготовленный 1:18(1+17) раствор RF-абсорбенту (желтый цвет)

Внести по 10 µl предварительно разведенных контролей и исследуемых образцов в лунки:

A1 – [CONTROL|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с желтого на зеленый)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

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

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

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

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс позитивности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

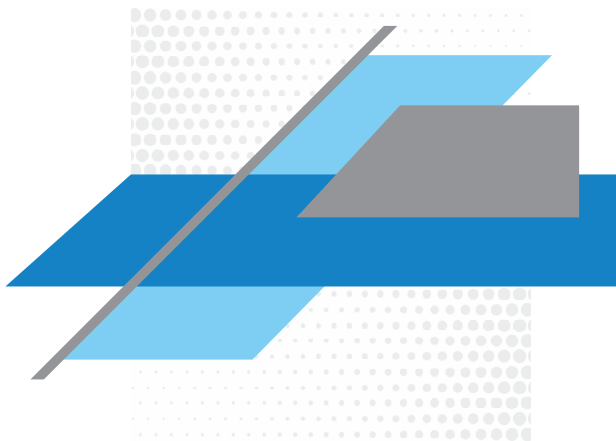
$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



HSV1+2 IgG

**ELISA kit for the qualitative and semi-quantitative
detection of IgG antibodies to herpes simplex virus
types 1 and 2**

Instructions for use



IVD

REF
EI-071

Σ 96
tests



EQUI HSV1+2 IgG

ELISA kit for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2

1. INTENDED USE

The «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit is intended to qualitatively and semi-quantitatively detect IgG antibodies to Herpes simplex virus Type 1 and 2 (HSV-1/2) in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose herpes virus infection. The testing procedure is designed for both manual arrangements with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analyzers.

Target group: women of childbearing age and pregnant women.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Herpes simplex virus (HSV) causes chronic, lifelong infection with recurrences in humans that occurs worldwide. The herpes simplex virus (HSV) is categorized into 2 types: HSV-1 and HSV-2. HSV-1 is causing oral herpes, HSV-2 causes genital herpes.

HSV belongs to the big *Herpesviridae* family, whose representatives are enveloped, double-stranded DNA viruses. HSV-1 and HSV-2 are similar to each other at the genetic level but differ in antigenic properties (especially in proteins of the outer membrane). An important characteristic of herpesviruses is their ability to persist in cells of the infected organism throughout life. Antibodies to HSV are detected in high concentrations during the whole life, however, they cannot prevent recurrences but only hinder the spread of HSV.

Infection with HSV type 1 (HSV-1) is typically transmitted via oral contact and HSV-2 is mainly sexually transmitted.

Herpes, even asymptomatic, can be detected by virus isolation in cell culture or by PCR testing of viral DNA in body fluids: whole blood, plasma, serum, saliva, cerebrospinal fluid, tears, semen, urine, breast milk etc. Another common method of diagnosis is the detection of specific antibodies to HSV-1/2 antigens. IgM antibodies appear within 7-10 days after primary infection, their titers rise during 1-2 months and then decreases. In some people, specific IgM antibodies can be detected for several months, sometimes up to a year, their titers increase slightly when the virus is reactivated. IgG antibodies begin to appear 3-4 weeks after infection, their titers increase rapidly and remain high throughout life. During reactivation, there may be a slight increase in the titers of specific IgG antibodies. The signs of primary herpes infection are detection of specific IgM antibodies and a fourfold increase in the titers of specific IgG antibodies in paired samples taken with interval of 14-20 days and studied in one analysis.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for IgG specific antibodies to HSV1/2 in «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Mixture of inactivated herpes simplex virus type 1 and 2 antigens is entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-HSV 1/2 antibodies (if present in the samples), bind to the solid phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species anti-IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow color is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS	1 x 96 wells	Microplate Each plate well is coated with a mixture of inactivated herpes simplex virus type 1 and 2 antigens. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8°C for a maximum of 6 months
PREDIL PLATE	1 x 96 wells	Plate for pre-dilution of sera
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Positive control Solution of specific immunoglobulins with preservative (pink). Store at 2-8°C
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative control Negative human serum with preservative (yellow). Store at 2-8°C
PREDIL SAMPLE	1 x 21 ml	Solution for pre-dilution of sera Buffer solution with detergent and preservative (brown). Store at 2-8 °C
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Serum dilution solution Buffer solution with milk extract, detergent and preservative (yellow). Store at 2-8°C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (violet). Store at 2-8 °C
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C

Washing solution TRITON (20x concentrated)

TRITON|WASH|20X 1 x 50 ml

20-fold phosphate buffer concentrate with Triton X-100 (colourless). Dilute TRITON detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days

Stop Solution (ready to use)

SOLN|STOP 1 x 13 ml

0.5 mol H₂SO₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for **SOLN|CONJ** and **SOLN|TMB**;
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles

for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TRITON WASH 20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

8.3. Pre-dilution of samples and controls

Dilute test samples and calibrators 10 times with **PREDIL SAMPLE**. To do this, add 90 µl of **PREDIL SAMPLE** to the required number of **PREDIL PLATE** wells (supplied) and add 10 µl of samples and controls. Carefully pipette the mixture when applying samples and calibrators, the color of the solution in the wells should change from brown to blue. The procedure for dilution of samples and controls should be performed immediately before analysis.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the required number of wells for analysis (five wells for calibrators and the required number for test samples), insert them into the frame of the ELISA plate. Be sure to include calibrator wells in each test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Prepare a pre-dilution of samples and controls per para. 8.3.

9.5. Add 90 µl of **DIL SAMPLE** into each plate well.

9.6. Add 10 µl of pre-diluted 1:10 controls and test samples into the wells:

CONTROL + – into well A1,

CONTROL - – into wells B1, C1, D1,
into wells B1, C1, D1.

Thus, the final dilution of the samples in the wells should be 1:100. During the application time, the color of the solution changes from yellow to green. Carefully pipette the mixture into the wells to prevent foaming.

- 9.7. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.8. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
 - aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 - add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 - aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 - repeat the washing step 4 more times;
 - after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.9. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37°C**.
- 9.10. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.8.
- 9.11. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells, do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.12. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at **a room temperature of 18-25 °C**. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.13. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.14. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

$$\overline{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \overline{Nc} + 0,2$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL + $OD \geq 1,2$

CONTROL - $OD \leq 0,150$

CONTROL - $\bar{N}c \times 0,5 \leq N_{cn} \leq \bar{N}c \times 2,0$ where N_{cn} is the OD for each N_c run

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{N}c$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Borderline samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

Use of the positivity index allows for a semi-quantitative comparative analysis of the level of specific antibodies in the dynamics of paired samples obtained from patients with an interval of 2-4 weeks. It should be borne in mind that IP_{sample} within 1,1 – 7,0 proportional to the content of specific antibodies. If IP_{sample} is higher 7,0, to correctly assess the content of specific antibodies, it is recommended to re-analyze the sample previously diluted 10 times **DIL SAMPLE**. When determining the final result in this case, multiply the value obtained IP_{sample} on the degree of dilution (x10).

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated with 32 repeats on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD_{av}	IP_{av}	CV, %
385	1,102	5,1	13,0
381	2,517	11,8	9,1

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for four days in four sets of analysis of 8 repeats in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
385	1,126	5,2	14,7
381	2,714	12,1	12,0

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0,21 mg/mL (361,8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11,3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To evaluate clinical sensitivity and specificity of «EQUI HSV1+2 IgG» EKISA kits, commercial sera control panel «Anti-Herpes Simplex Virus Type 1&2 Mixed Titer Performance Panel PTH201» (SeraCare Life Sciences, USA), which consists of 25 characterized samples of serum and human blood plasma was used. In «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit 20 panel samples were determined as positive and 1 sample was determined as uncertain. Obtained results correspond with the passport data.

Method characteristics in comparison with equal CE marked commercial ELISA kit was studied in target group of pregnant women and donor samples (total 305 samples). For these samples relative sensitivity of «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit was 99,3%, percent agreement – 97,6%, total prevalence in population – 91,5%, which corresponds to the literature data. Relative specificity studies were performed on 44 sera that did not contain IgG antibodies to Herpes simplex virus Type 1 and 2 (according to the results obtained in a commercial comparison test system). For these samples relative specificity of «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit was 97,7%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit support presence of specific IgG antibodies to Herpes simplex virus Type 1 and/or 2 that are produced when infected with HSV-1 and/or HSV-2.

For the correct diagnosis of herpes virus infection, it is recommended to conduct a study for the presence of IgG antibodies in paired samples obtained with a blood drive interval of at least two weeks. Detection of specific IgM antibodies (e.g. in «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit) should also be performed. Interpretation of results should be based on results of complex laboratory tests and clinical manifestations of the disease.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use

Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. CDC Fact Sheet - Genital Herpes // <https://www.cdc.gov/std/herpes/stdfact-herpes.htm>.
2. Johnston C. and Corey L. Current Concepts for Genital Herpes Simplex Virus Infection: Diagnostics and Pathogenesis of Genital Tract Shedding // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2016. - Vol. 29, No. 1. - P. 149-161.
3. Ho D.W. Field P.R. et al. Detection of immunoglobulin M antibodies to glycoprotein G-2 by western blot (immunoblot) for diagnosis of initial herpes simplex virus type 2 genital infections // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1993. - Vol. 31, No. 12. - P. 3157-3164.
4. Nicoll M.P., Proença J.T. and Efsthathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2012. - Vol. 36, No. 3. - P. 684–705.
5. Page J., Taylor J. et al. Is HSV serology useful for the management of first episode genital herpes? // *Sexually Transmitted Infections*. - 2003. - Vol.79. - P. 276-279.
6. Simmons A. Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2002. - Vol.186(1). - P. S71–S77.
7. Waggoner-Fountain L. A. and Grossman L. B. Herpes Simplex Virus // *Pediatrics in Review*. - 2004. - Vol. 25, No. 3. - P. 86–93.
8. WHO. Herpes simplex virus // <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Mark of compliance with technical regulations

Edition 6, 23.12.2021

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Add 90 µl of [PREDIL][SAMPLE] into [PREDIL][PLATE] and 10 µl each of the tested samples and controls
(the color changes from brown to blue)

Add 90 µl of [DIL][SAMPLE] into all wells [STRIPS] plate
(yellow)

Add 10 µl of pre-diluted controls and test samples into the wells:
A1 – [CONTROL][+], B1, C1, D1 – [CONTROL][-],
E1 and other wells – test samples
(change of colour from yellow to green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TRITON
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells
(violet)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TRITON
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

$$CO = \overline{Nc} + 0,2;$$

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

$\overline{Nc}$ - the average value of OD 3x [CONTROL][-]

CO - cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

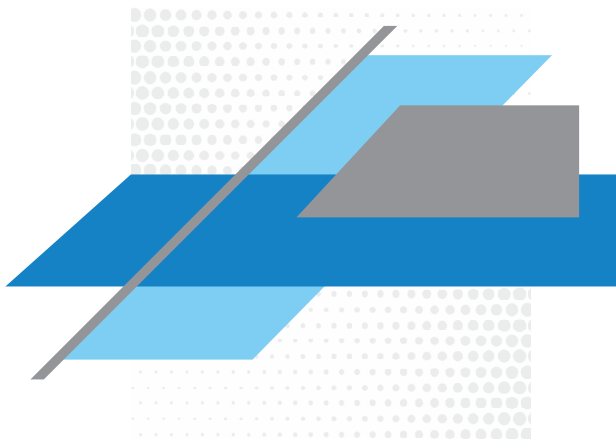
$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE



HSV1+2 IgM

**ELISA kit for the qualitative detection of IgM
antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2**

Instructions for use



IVD

REF
EI-072

Σ 96
tests



EQUI HSV1+2 IgM

ELISA kit for the qualitative detection of IgM antibodies
to herpes simplex virus types 1 and 2

1. INTENDED USE

The «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit is intended to qualitatively detect IgM antibodies to Herpes simplex virus Type 1 and 2 (HSV-1/2) in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose acute herpes virus infection. The testing procedure is designed for both manual arrangements with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: women of childbearing age and pregnant women.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Herpes simplex virus (HSV) causes chronic, lifelong infection with recurrences in humans that occurs worldwide. The herpes simplex virus (HSV) is categorized into 2 types: HSV-1 and HSV-2. HSV-1 is causing oral herpes, HSV-2 causes genital herpes.

HSV belongs to the big *Herpesviridae* family, whose representatives are enveloped, double-stranded DNA viruses. HSV-1 and HSV-2 are similar to each other at the genetic level but differ in antigenic properties (especially in proteins of the outer membrane). An important characteristic of herpesviruses is their ability to persist in cells of the infected organism throughout life. Antibodies to HSV are detected in high concentrations during the whole life, however, they cannot prevent recurrences but only hinder the spread of HSV.

Infection with HSV type 1 (HSV-1) is typically transmitted via oral contact and HSV-2 is mainly sexually transmitted.

Herpes, even asymptomatic, can be detected by virus isolation in cell culture or by PCR testing of viral DNA in body fluids: whole blood, plasma, serum, saliva, cerebrospinal fluid, tears, semen, urine, breast milk etc. Another common method of diagnosis is the detection of specific antibodies to HSV-1/2 antigens. IgM antibodies appear within 7-10 days after primary infection, their titers rise during 1-2 months and then decrease. In some people, specific IgM antibodies can be detected for several months, sometimes up to a year, their titers increase slightly when the virus is reactivated. IgG antibodies begin to appear 3-4 weeks after infection, their titers increase rapidly and remain high throughout life. During reactivation, there may be a slight increase in the titers of specific IgG antibodies. The signs of primary herpes infection are detection of specific IgM antibodies and a fourfold increase in the titers of specific IgG antibodies in paired samples taken with interval of 14-20 days and studied in one analysis.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for IgM specific antibodies to HSV1/2 in «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit is based on «IgM trapping» of solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Monoclonal antibodies specific to IgM human immunoglobulins are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, IgM immunoglobulins (if present in the samples) bind to the monoclonal antibodies on the solid phase. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antibody-antibody complexes left. Then, mix of peroxidase conjugates of gG1 and gG2 recombinant antigens (analogues of glycoproteins HSV-1 and HSV-2) is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Immune complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow color is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS	1 x 96 wells	Microplate
		Each plate well is coated with monoclonal antibodies specific for human IgM immunoglobulins. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Positive control
		Solution of human IgM immunoglobulins crosslinked with monoclonal antibodies, specific for horseradish peroxidase with preservative (pink). Store at 2-8 °C
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative control
		Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Serum dilution solution
		Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (violet). Store at 2-8 °C
CONJ 11x	1 x 1,3 ml	Conjugate (11x concentrate)
		11-fold concentrate of recombinant HSV-1 and HSV-2 (gG1 and gG2) antigens conjugate with horseradish peroxidase, with stabilizers (violet). Store at 2-8 °C
		Dilute the conjugate (11x) at 1:11 with a conjugate dilution solution before use (e. g., 100 µL of concentrate + 1 mL of conjugate dilution solution is enough for 8 wells). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 24 hours

DIL CONJ	1 x 14 ml	Conjugate dilution solution Buffer solution with a detergent and a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
TRITON WASH 20x	1 x 50 ml	Washing solution TRITON (20x concentrated) 20-fold phosphate buffer concentrate with Triton X-100 (colourless). Dilute TRITON detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
SOLN STOP	1 x 13 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620-695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for conjugate solution and **SOLN|TMB**;

- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and conjugate solution with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with

patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TRITON|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

8.3. Conjugate solution preparation

Prepare conjugate working dilution as follows: dilute **CONJ|11x** (violet) in a clean vial with **DIL|CONJ** (yellow) solution at the ratio of 1:11 (i. e. 1+10); the solution turns green. For example, to fill 8 test wells, add 100 µL of **CONJ|11x**. The working dilution of conjugate solution remains stable for 24 hours if stored at 2-8 °C.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the required number of wells for analysis (five wells for calibrators and the required number for test samples), insert them into the frame of the ELISA plate. Be sure to include calibrator wells in each test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Add 90 µL of **DIL|SAMPLE** into each plate well.

9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:

CONTROL+ – into well A1,
CONTROL- – into wells B1, C1, D1,

and test samples into the remaining wells.

At the time of adding, the solution changes its colour from violet to blue.
Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.

- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
- aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 - add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 - aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 - repeat the washing step 4 more times;
 - after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Prepare the conjugate solution as per para. 8.3.
- 9.9. Add 100 µL of conjugate solution into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes** at a **room temperature 18-25°C**.
- 9.10. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.11. Add 100 µL of **SOLN|TMB** into the wells, do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.12. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a **room temperature of 18-25 °C**. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.13. Add 100 µL of **SOLN|STOP** into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding **SOLN|TMB**. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.14. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

*Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only **SOLN|TMB** and **SOLN|STOP** must be added in blank well).*

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\bar{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,2$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}} / CO, \text{ where } OD_{\text{sample}} \text{ is the OD sample}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

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

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

$$\boxed{\text{CONTROL}-} \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{where } Ncn \text{ is the OD for each } Nc \text{ run}$$

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$$\begin{array}{ll} IP_{\text{sample}} > 1,1 & \text{POSITIVE} \\ 0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1 & \text{BORDERLINE*} \\ IP_{\text{sample}} < 0,9 & \text{NEGATIVE} \end{array}$$

* Borderline samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated with 32 repeats on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
637	0,769	3,1	4,0
1487	1,258	5,1	4,8

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for four days in four sets of analysis of 8 repeats in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
637	0,726	3,1	7,3
1487	1,180	5,0	7,5

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 μmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To evaluate clinical sensitivity and specificity of «EQUI HSV1+2 IgM» EKISA kits, commercial sera control panel «Anti-Herpes Simplex Virus Type 1&2 Mixed Titer Performance Panel PTH201» (SeraCare Life Sciences, USA), which consists of 25 characterized samples of serum and human blood plasma was used. In «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit 7 panel samples were determined as positive. Obtained results correspond with the passport data.

Method characteristics in comparison with equal CE marked commercial ELISA kit was studied in target group of pregnant women (124 samples). For these samples relative specificity of «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit was 97.4%, percent agreement – 97.4%. Relative sensitivity studies were performed on 35 sera that contained IgM antibodies to Herpes simplex virus Type 1 and 2 (according to the results obtained in a commercial comparison test system). For these samples relative sensitivity of «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit was 94.3%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI HSV1+2 IgM» ELISA kit support presence of specific IgM antibodies to Herpes simplex virus Type 1 and/or Type 2.

HSV-specific IgM antibodies are present during acute herpes virus infection. Antibodies of this class are not always evidence of primary herpes virus infection. Specific IgM antibodies may also be synthesized upon relapse. To differentiate primary herpes virus infection and past infection, it is recommended to analyze sample for specific IgG antibodies (for example, in «EQUI HSV1+2 IgG» ELISA kit). If the sample is obtained after a short amounts of time after infection, IgM class antibodies may not be detected.

If the sample is obtained in a short time after infection, specific IgM antibodies may not be detected.

Results obtained from immunosuppressed individuals should be interpreted with caution.

Final diagnosis can't be established only based on the results of a serological test. Interpretation of results should be based on results of complex laboratory tests and clinical manifestations of the disease.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants

Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. CDC Fact Sheet - Genital Herpes // <https://www.cdc.gov/std/herpes/stdfact-herpes.htm>.
2. Johnston C. and Corey L. Current Concepts for Genital Herpes Simplex Virus Infection: Diagnostics and Pathogenesis of Genital Tract Shedding // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2016. - Vol. 29, No. 1. - P. 149-161.
3. Ho D.W. Field P.R. et al. Detection of immunoglobulin M antibodies to glycoprotein G-2 by western blot (immunoblot) for diagnosis of initial herpes simplex virus type 2 genital infections // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1993. - Vol. 31, No. 12. - P. 3157-3164.
4. Nicoll M.P., Proença J.T. and Efsthathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2012. - Vol. 36, No. 3. - P. 684–705.
5. Page J., Taylor J. et al. Is HSV serology useful for the management of first episode genital herpes? // *Sexually Transmitted Infections*. - 2003. - Vol.79. - P. 276-279.
6. Simmons A. Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2002. - Vol.186(1). - P. S71–S77.
7. Waggoner-Fountain L. A. and Grossman L. B. Herpes Simplex Virus // *Pediatrics in Review*. - 2004. - Vol. 25, No. 3. - P. 86–93.
8. WHO. Herpes simplex virus // <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Mark of compliance with technical regulations

Edition 6, 08.12.2021

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Add 90 µl of [DIL|SAMPLE] into all wells [STRIPS] plate (violet)

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

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TRITON (300 µl per well)

Add 100 µl of the prepared 1:11 (1+10) conjugate solution to the wells of the strips (green)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 18-25°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TRITON (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN|TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN|STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at 450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

$$CO = \bar{Nc} + 0,2;$$

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

$\bar{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL|-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

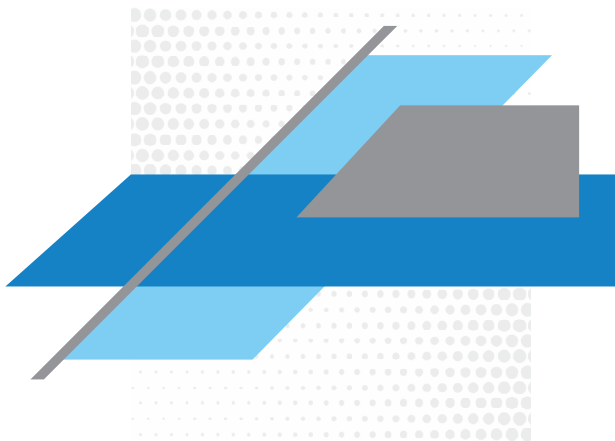
$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



Chlamydia trachomatis IgG

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

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-102

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI *Chlamydia trachomatis* IgG

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS

1 x 96
лунок

Планшет ИФА

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

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

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

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

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

5.2. Техника безопасности

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

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

5.3. Инактивация и утилизация отходов

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

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

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

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка планшета ИФА

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

8.2. Приготовление промывочного раствора

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

9.2. Заполните схему внесения образцов.

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

9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl **DIL|SAMPLE**.

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

CONTROL|IgG|+ – в лунку A1,

CONTROL|– – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

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

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

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

- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
- наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
- аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
- повторите процедуру промывания еще пять раз;
- после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

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

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

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

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

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

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

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

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

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

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

ОП $\geq 1,5$

ОП $\leq 0,150$

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

где N_{cn} – ОП
каждого повтора
 N_c

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели. При этом следует учитывать, что IP_{sample} в пределах 1,1 – 7,0 пропорционален содержанию специфических антител. Если IP_{sample} составляет выше 7,0, для корректной оценки содержания специфических антител рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разбавленного в 10 раз

. При определении конечного результата в таком случае следует умножить полученное значение IP_{sample} на степень разведения ($\times 10$).

Интерпретация результатов обнаружения антител к *Chlamydia trachomatis*

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

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

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

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

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

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

Аналитическая специфичность

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

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

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

11.2. Диагностические характеристики

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

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

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

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

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

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

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

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

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

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

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомиться с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 13.12.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквитестлаб»

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

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

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

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

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

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

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс позитивности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

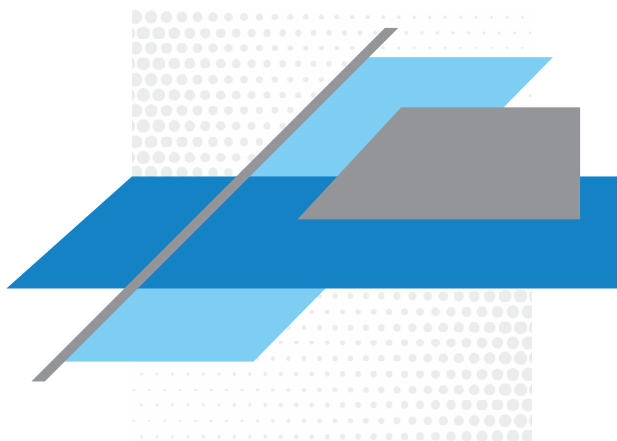
$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Chlamydia trachomatis IgA

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

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-103

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI *Chlamydia trachomatis* IgA

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

STRIPS

1 x 96
лунок

Планшет ИФА

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

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

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережение

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

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

5.2. Техника безопасности

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

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

5.3. Инактивация и утилизация отходов

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

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

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

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка планшета ИФА

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

8.2. Приготовление промывочного раствора

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

CONTROL|IgA|+ – в лунку A1,

CONTROL|– – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

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

- 9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
- удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
 - повторите процедуру промывания еще пять раз;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Внесите в лунки по 100 µl **SOLN|CONJ|IgA**. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Внесите в лунки по 100 µl **SOLN|TMB**, не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl **SOLN|STOP** для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **SOLN|TMB**. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.
- 9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

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

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

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

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

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

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

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

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

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

Интерпретация результатов обнаружения антител к *Chlamydia trachomatis*

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

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

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

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

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

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

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

Аналитическая специфичность

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

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

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

11.2. Диагностические характеристики

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

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

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

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

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

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

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

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

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

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

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

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 13.12.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»

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

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

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

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

Nc - Среднее значение ОП 3-х **[CONTROL|–]**

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс позитивности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

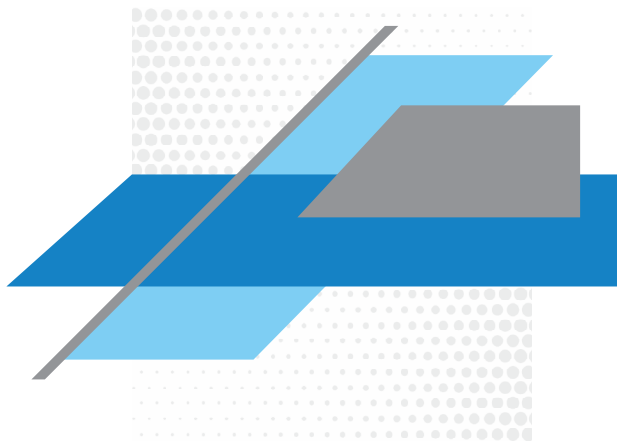
$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



Helicobacter IgG

ELISA kit for the qualitative and semiquantitative
detection of IgG antibodies to CagA protein of
Helicobacter pylori

Instructions for use



IVD

REF
EI-502

Σ 96
tests

CE

EQUI *Helicobacter* IgG

ELISA kit for the qualitative and semiquantitative detection of IgG antibodies to CagA protein of *Helicobacter pylori*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Helicobacter* IgG» is ELISA kit intended to qualitatively and semi-quantitatively detect anti-CagA protein *Helicobacter pylori* IgG in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose helicobacteriosis. Using a set «EQUI *Helicobacter* IgG Calibrators» with «EQUI *Helicobacter* IgG» kit allows quantification of anti-CagA *Helicobacter pylori* IgG.

Target group: patients with involvement of upper digestive tract, children, young people.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Helicobacter pylori is the most important bacteria which colonises gastric mucosa in human. Helicobacteriosis is associated with the development of gastric and duodenal ulcers, duodenitis, gastritis, as well as gastric malignancies.

Helicobacter pylori is a mobile helicoid Gram-negative bacterium, 3 µm in length, which may have 4 to 8 filaments. In addition to lytic enzymes, which lyse mucus and damage the cells of gastric mucosa, *Helicobacter pylori* may produce exotoxins (e.g., VacA, which results in vacuolization, damage and death of the host cells). Although, the most important are effector proteins CagA, which are secreted directly in the mucosal cell and may induce inflammation, overgrowth of cells and impairment of their apoptosis. Namely this protein is associated with gastric lymphoma and carcinoma. *Helicobacter pylori* strains are very heterogeneous, the degree of their virulence and aggressive effect on the human body are associated with the ability to secrete VacA and CagA.

Helicobacter pylori colonization may last for long without clinical manifestations and without detection of parasite with the immune system. However, aggravation of *Helicobacter* infection may be accompanied by typical signs of gastroduodenitis: abdominal discomfort and pain, indigestion, heartburn, etc. Development of gastritis, duodenitis, gastric and duodenal ulcers, as well as gastric MALT lymphoma and adenocarcinoma is associated with *Helicobacter pylori*. These diseases may develop decades away after infection: the risk of peptic ulcer in *Helicobacter*-positive patients reached 20 %, gastric cancer — 1–2 %. At the same time, severity of digestive tract involvement correlates with spread and virulence of *Helicobacter pylori* strains. For example, strains that express VacA exotoxins are isolated in gastritis patients more commonly than in asymptomatic carriers. *Helicobacter pylori* strains, which secrete CagA are more biochemically aggressive. They are isolated in the vast majority of patients with gastric and duodenal ulcer and in patients with gastric cancer. Those strains that do not express VacA and CagA are not associated with severe involvement of hepatobiliary system.

Timely detection and treatment of helicobacteriosis simultaneously results in elimination of inflammatory processes in the stomach, reduces the possibility of re-occurrence of duodenal ulcers and malignancies. Histological detection of the causative agent in patient tissues is considered as the gold standard in diagnosis of *Helicobacter* infection, and alternative variant is its isolation in the culture. Among non-invasive methods, breathing urease test and detection of anti-*Helicobacter pylori* antibodies are the most essential. CagA antigen is the most immunogenic. Anti-CagA antibodies are detected in the vast majority (up to 100 %) of patients with peptic ulcer and in 95 % patients with gastric cancer.

IgM antibodies are considered the sign of acute infection and are detected in 10 % of patients with clinical manifestations of helicobacteriosis or in 1–2 % of asymptomatic carriers. Specific IgA antibodies may serve as the marker of active and chronic infection: they are detected in about 5 % of patients at the background of the lack of other antibodies and in up to 70 % of IgG seropositive patients. Detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG is commonly used for screening of asymptomatic carriers and for evaluation of treatment efficacy. Decrease in the titre of specific IgG antibodies by 40 to 50 % is reported in half a year after the successful treatment and eradication of *Helicobacter pylori*.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-CagA *Helicobacter pylori* IgG in «EQUI *Helicobacter* IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. CagA *Helicobacter pylori* recombinant antigen is entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Helicobacter pylori* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620–695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS

1 x 96
wells

Microplate

Each plate well is coated with CagA *Helicobacter pylori* recombinant antigen. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2–8 °C for a maximum of 6 months

		Positive control
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Solution of conjugate specific monoclonal antibodies with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
		TMB solution (ready to use)
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
		Washing solution TWEEN (20x concentrated)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
		Stop Solution (ready to use)
SOLN STOP	1 x 13 ml	0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620-695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI Helicobacter IgG» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;

- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI Helicobacter IgG» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;

- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.
- 9.2. Fill in the sample application plan.
- 9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.
- 9.4. Add 90 µL of [DIL|SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
[CONTROL|+] – into well A1,
[CONTROL|-] – into wells B1, C1 and D1,
and test samples into the remaining wells.
At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
– aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
– add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
– aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
– repeat the washing step 4 more times;
– after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25°C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added

in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

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

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

$$\boxed{\text{CONTROL} -} \quad \overline{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \overline{Nc} \times 2,0 \quad \text{where } Ncn \text{ is the OD for each } Nc \text{ run}$$

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\overline{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

Children	Adults	Interpretation
$IP_{sample} > 0,9$	$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,8 \leq IP_{sample} \leq 0,9$	$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,8$	$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

Use of the positivity index allows for a semi-quantitative comparative analysis of the level of specific antibodies in the dynamics of paired samples obtained from patients with an interval of 2-4 weeks. It should be borne in mind that IP_{sample} within 1,1 – 7,0 proportional to the content of specific antibodies. If IP_{sample} is higher 7,0, to correctly assess the content of specific antibodies, it is recommended to re-analyze the sample previously diluted 10 times $\boxed{\text{DIL SAMPLE}}$. When determining the final result in this case, multiply the value obtained IP_{sample} on the degree of dilution (x10).

To quantify IgG antibodies specific for the CagA Helicobacter pylori protein, it is recommended to test samples for specific antibodies in the «EQUI Helicobacter IgG» ELISA kit together with the «EQUI Helicobacter IgG Calibrators» kit according to the instructions in the calibrator kit.

**Interpretation of antibody detection results to
CagA protein *Helicobacter pylori***

The presence of specific antibodies to CagA protein <i>Helicobacter pylori</i>			Interpretation of the result
IgG	IgA	IgM	
Missing	Missing	Missing	Sample does not contain specific antibodies or their concentration is below the sensitivity limit of the analysis
Missing	It turns out	It turns out	Probable early stage of infection, it is recommended to repeat the study in 2-3 weeks
It turns out	It turns out	Missing	
Missing	Missing	It turns out	
It turns out	Missing	Missing	Probable acute or transferred infection, it is recommended to carry out a complex of additional inspections: bacteriological, endoscopic, urease test
It turns out	It turns out	It turns out	
It turns out	It turns out	Missing	

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
719	2,196	7,9	6,8
225	1,074	3,9	7,8

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 3 days in 3 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
719	2,229	8,1	8,1
225	1,025	3,7	10,0

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 μmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To measure sensitivity and specificity of «EQUI *Helicobacter* IgG» ELISA kits in comparison with analogous commercial ELISA kit, 99 serum samples from pregnant females and 284 serum samples from donors (383 samples in total) were used. The results of detection of anti-CagA *Helicobacter pylori* IgG with «EQUI

Helicobacter IgG» ELISA kits are comparable with the results using analogous commercial CE labelled ELISA kits. A relative sensitivity of «EQUI Helicobacter IgG» ELISA kits was 99.1 %, relative specificity — 95.9 %, percent agreement — 97.96 %. Total prevalence in the population was 64.13 % that is completely in line with literature data.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI Helicobacter IgG» ELISA kit supports presence of anti-CagA *Helicobacter pylori* specific IgG antibodies. These antibodies are produced in the body when a man is infected with *Helicobacter pylori* strains which express CagA.

Negative result of «EQUI Helicobacter IgG» ELISA kit suggests the absence of anti-CagA *Helicobacter pylori* specific IgG in the serum. These antibodies are also not detected in patients infected with *Helicobacter pylori* strains which do not express CagA. It should be noted that in case of early *Helicobacter pylori* infection, ELISA results may be negative due to the lack of antibodies. If clinical signs of the disease appears, re-test is recommended in at least two weeks.

For comprehensive serological diagnosis of *Helicobacter pylori*, it is also recommended to test for specific anti-CagA IgA and IgM using «EQUI Helicobacter IgA» and «EQUI Helicobacter IgM» ELISA kits, respectively.

The results of serological test only are not the basis for final diagnosis. When establishing the diagnosis, the results of complex laboratory and instrumental tests, as well as clinical manifestations should be considered.

To monitor the effectiveness of the therapy and eradication of the pathogen, it is recommended to conduct a study for the presence of specific antibodies in samples obtained 6-12 months after therapy.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
High background in all wells	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
High background in a row of wells	

Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Alem M., Alem N. et al. Diagnostic value of detection of IgM antibodies to *Helicobacter pylori* // Experimental and Molecular Pathology. - 2002. - Vol. 72. - P. 77–83.
2. Andersen L. P., Rosenstock S. J. et al. Seroprevalence of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies to *Helicobacter pylori* in an Unselected Danish Population // American Journal of Epidemiology. – 1996. - Vol. 143, No. 11. - P. 1157–1164.
3. Bauer B. and Meyer T. F. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease // Ulcers. - 2011. - Article ID 340157.- 23 p.
4. Blaser M. J. and Atherton J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease // Journal of Clinical Investigation. - 2004. - Vol. 113(3). - P. 321–333.
5. Chaput C., Ecobichon C. et al. Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape // PLoS Pathogens. – 2006. – Vol. 2, No. 9, e97. – P.0844–0852.
6. Hunt R.H., Xiao S. D. et al. *Helicobacter Pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. // Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases. - 2011. - Vol. 20, No 3. - P. 299–304.
7. Hussein N. R., Mohammadi M. et al. Differences in Virulence Markers between *Helicobacter pylori* Strains from Iraq and Those from Iran: Potential Importance of Regional Differences in H. pylori-Associated Disease // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46, No. 5. – P. 1774–1779.
8. Kusters J. G., Van Vliet A. H. M. and Kuipers E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection // Clinical Microbiology Reviews. – 2006. – Vol. 19 (3). - P. 449–490.
9. López-Vidal Y., Ponce-de-León S. et al. High Diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, No. 12. — P. e3849.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 7, 23.06.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.



Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasytkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL|SAMPLE] into the wells (brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN|CONJ] into all wells (green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN|TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN|STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at 450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

$\overline{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL|-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

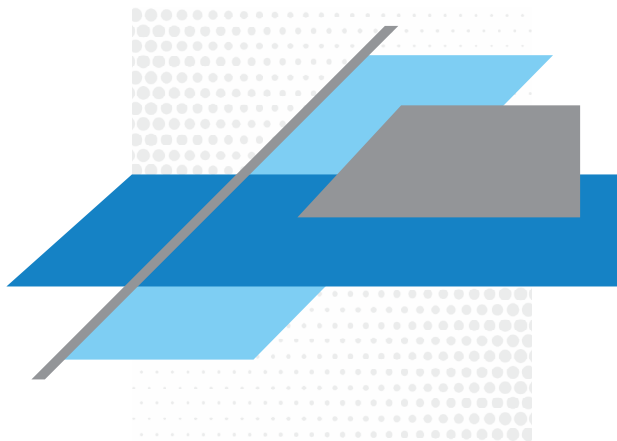
Children	Adults	Interpretation
$IP_{sample} > 0,9$	$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,8 \leq IP_{sample} \leq 0,9$	$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,8$	$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



Helicobacter IgA

ELISA kit for the qualitative and semiquantitative
detection of IgA antibodies to CagA protein of
Helicobacter pylori

Instructions for use



IVD

REF
EI-503

Σ 96
tests



EQUI *Helicobacter* IgA

ELISA kit for the qualitative and semiquantitative detection of IgA antibodies to CagA protein of *Helicobacter pylori*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Helicobacter* IgA» is ELISA kit intended to qualitatively and semi-quantitatively detect anti-CagA protein *Helicobacter pylori* IgA in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose helicobacteriosis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: patients with involvement of upper digestive tract, children, young people.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Helicobacter pylori is the most important bacteria which colonises gastric mucosa in human. Helicobacteriosis is associated with the development of gastric and duodenal ulcers, duodenitis, gastritis, as well as gastric malignancies.

Helicobacter pylori is a mobile helicoid Gram-negative bacterium, 3 µm in length, which may have 4 to 8 filaments. In addition to lytic enzymes, which lyse mucus and damage the cells of gastric mucosa, *Helicobacter pylori* may produce exotoxins (e.g., VacA, which results in vacuolization, damage and death of the host cells). Although, the most important are effector proteins CagA, which are secreted directly in the mucosal cell and may induce inflammation, overgrowth of cells and impairment of their apoptosis. Namely this protein is associated with gastric lymphoma and carcinoma. *Helicobacter pylori* strains are very heterogeneous, the degree of their virulence and aggressive effect on the human body are associated with the ability to secrete VacA and CagA.

Helicobacter pylori colonization may last for long without clinical manifestations and without detection of parasite with the immune system. However, aggravation of *Helicobacter* infection may be accompanied by typical signs of gastroduodenitis: abdominal discomfort and pain, indigestion, heartburn, etc. Development of gastritis, duodenitis, gastric and duodenal ulcers, as well as gastric MALT lymphoma and adenocarcinoma is associated with *Helicobacter pylori*. These diseases may develop decades away after infection: the risk of peptic ulcer in *Helicobacter*-positive patients reached 20 %, gastric cancer — 1–2 %. At the same time, severity of digestive tract involvement correlates with spread and virulence of *Helicobacter pylori* strains. For example, strains that express VacA exotoxins are isolated in gastritis patients more commonly than in asymptomatic carriers. *Helicobacter pylori* strains, which secrete CagA are more biochemically aggressive. They are isolated in the vast majority of patients with gastric and duodenal ulcer and in patients with gastric cancer. Those strains that do not express VacA and CagA are not associated with severe involvement of hepatobiliary system.

Timely detection and treatment of helicobacteriosis simultaneously results in elimination of inflammatory processes in the stomach, reduces the possibility of re-occurrence of duodenal ulcers and malignancies. Histological detection of the causative agent in patient tissues is considered as the gold standard in diagnosis of *Helicobacter* infection, and alternative variant is its isolation in the culture. Among non-invasive methods, breathing urease test and detection of anti-*Helicobacter pylori* antibodies are the most essential. CagA antigen is the most immunogenic. Anti-CagA antibodies are detected in the vast majority (up to 100 %) of patients with peptic ulcer and in 95 % patients with gastric cancer.

IgM antibodies are considered the sign of acute infection and are detected in 10 % of patients with clinical manifestations of helicobacteriosis or in 1–2 % of asymptomatic carriers. Specific IgA antibodies may serve as the marker of active and chronic infection: they are detected in about 5 % of patients at the background of the lack of other antibodies and in up to 70 % of IgG seropositive patients. Detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG is commonly used for screening of asymptomatic carriers and for evaluation of treatment efficacy. Decrease in the titre of specific IgG antibodies by 40 to 50 % is reported in half a year after the successful treatment and eradication of *Helicobacter pylori*.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-CagA *Helicobacter pylori* IgA in «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. CagA *Helicobacter pylori* recombinant antigen is entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Helicobacter pylori* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgA monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620–695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS

1 x 96
wells

Microplate

Each plate well is coated with CagA *Helicobacter pylori* recombinant antigen. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2–8 °C for a maximum of 6 months

CONTROL +	1 x 0,25 ml	Positive control Solution of conjugate specific monoclonal antibodies with preservative (pink). Store at 2-8 °C
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative control Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Serum dilution solution Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgA, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (orange). Store at 2-8 °C
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	Washing solution TWEEN (20x concentrated) 20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
SOLN STOP	1 x 13 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620-695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI Helicobacter IgA» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;

- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI Helicobacter IgA» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;

- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.
- 9.2. Fill in the sample application plan.
- 9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.
- 9.4. Add 90 µL of [DIL|SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
[CONTROL|+] – into well A1,
[CONTROL|-] – into wells B1, C1 and D1,
and test samples into the remaining wells.
At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
– aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
– add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
– aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
– repeat the washing step 4 more times;
– after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added

in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

$$\boxed{\text{CONTROL} +} \quad OD \geq 1,0$$

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

$$\boxed{\text{CONTROL} -} \quad \overline{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \overline{Nc} \times 2,0 \quad \text{where } Ncn \text{ is the OD for each } Nc \text{ run}$$

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\overline{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

Children	Adults	Interpretation
$IP_{sample} > 0,9$	$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,8 \leq IP_{sample} \leq 0,9$	$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,8$	$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

Use of the positivity index allows for a semi-quantitative comparative analysis of the level of specific antibodies in the dynamics of paired samples obtained from patients with an interval of 2-4 weeks. It should be borne in mind that IP_{sample} within 1,1 – 7,0 proportional to the content of specific antibodies. If IP_{sample} is higher 7,0, to correctly assess the content of specific antibodies, it is recommended to re-analyze the sample previously diluted 10 times $\boxed{\text{DIL SAMPLE}}$. When determining the final result in this case, multiply the value obtained IP_{sample} on the degree of dilution (x10).

Interpretation of antibody detection results to CagA protein *Helicobacter pylori*

The presence of specific antibodies to CagA protein <i>Helicobacter pylori</i>			Interpretation of the result
IgG	IgA	IgM	
Missing	Missing	Missing	Sample does not contain specific antibodies or their concentration is below the sensitivity limit of the analysis
Missing	It turns out	It turns out	Probable early stage of infection, it is recommended to repeat the study in 2-3 weeks
It turns out	It turns out	Missing	
Missing	Missing	It turns out	
It turns out	Missing	Missing	Probable acute or transferred infection, it is recommended to carry out a complex of additional inspections: bacteriological, endoscopic, urease test
It turns out	It turns out	It turns out	
It turns out	It turns out	Missing	

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
680	0,458	1,6	11,3
696	1,776	6,4	9,2

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 3 days in 3 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
680	0,470	1,7	15,4
696	1,779	6,4	7,4

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To measure sensitivity and specificity of «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kits, serum samples from donors and pregnant females (383 samples in total) were used. The «EQUI *Helicobacter* IgA» kits have found that is a random set of serum samples, 23 % of samples contained anti-CagA *Helicobacter pylori* IgA. In 93.2 % IgA positive samples, anti-*Helicobacter pylori* IgG were also found. Alternatively, among all anti-*Helicobacter pylori* IgG positive donors, 31.0 % had specific anti-

Helicobacter IgA. Prevalence of the marker in the population calculated from the results of «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kit is comparable with the study results from scientific literature.

When studying comparative characteristics of the method, the results of detection of anti-CagA *Helicobacter pylori* IgA with «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kits are comparable with the results using analogous commercial CE labelled ELISA kit. A relative specificity of «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kit was 92.0 %.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kit supports presence of anti-CagA *Helicobacter pylori* specific IgA antibodies. These antibodies are produced in the body when a man is infected with *Helicobacter pylori* strains which express CagA.

Negative result of «EQUI *Helicobacter* IgA» ELISA kit suggests the absence of anti-CagA *Helicobacter pylori* specific IgA in the serum. These antibodies are also not detected in patients infected with *Helicobacter pylori* strains which do not express CagA. It should be noted that in case of early *Helicobacter pylori* infection, ELISA results may be negative due to the lack of antibodies. If clinical signs of the disease appears, re-test is recommended in at least two weeks.

For comprehensive serological diagnosis of *Helicobacter pylori*, it is also recommended to test for specific anti-CagA IgG and IgM using «EQUI *Helicobacter* IgG» and «EQUI *Helicobacter* IgM» ELISA kits, respectively.

The results of serological test only are not the basis for final diagnosis. When establishing the diagnosis, the results of complex laboratory and instrumental tests, as well as clinical manifestations should be considered.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
High background in all wells	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
High background in a row of wells	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once

Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Alem M., Alem N. et al. Diagnostic value of detection of IgM antibodies to *Helicobacter pylori* // Experimental and Molecular Pathology. - 2002. - Vol. 72. - P. 77–83.
2. Andersen L. P., Rosenstock S. J. et al. Seroprevalence of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies to *Helicobacter pylori* in an Unselected Danish Population // American Journal of Epidemiology. – 1996. - Vol. 143, No. 11. - P. 1157–1164.
3. Bauer B. and Meyer T. F. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease // Ulcers. - 2011. - Article ID 340157.- 23 p.
4. Blaser M. J. and Atherton J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease // Journal of Clinical Investigation. - 2004. - Vol. 113(3). - P. 321–333.
5. Chaput C., Ecobichon C. et al. Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape // PLoS Pathogens. – 2006. – Vol. 2, No. 9, e97. – P.0844–0852.
6. Hunt R.H., Xiao S. D. et al. *Helicobacter Pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. // Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases. - 2011. - Vol. 20, No 3. - P. 299–304.
7. Hussein N. R., Mohammadi M. et al. Differences in Virulence Markers between *Helicobacter pylori* Strains from Iraq and Those from Iran: Potential Importance of Regional Differences in H. pylori-Associated Disease // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46, No. 5. – P. 1774–1779.
8. Kusters J. G., Van Vliet A. H. M. and Kuipers E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection // Clinical Microbiology Reviews. – 2006. – Vol. 19 (3). - P. 449–490.
9. López-Vidal Y., Ponce-de-León S. et al. High Diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, No. 12. — P. e3849.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Mark of compliance with technical regulations

Edition 6, 12.10.2021

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL|SAMPLE] into the wells (brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN|CONJ] into all wells (orange)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN|TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN|STOP] into all wells (change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at 450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

Nc - the average value of OD 3-x [CONTROL|-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

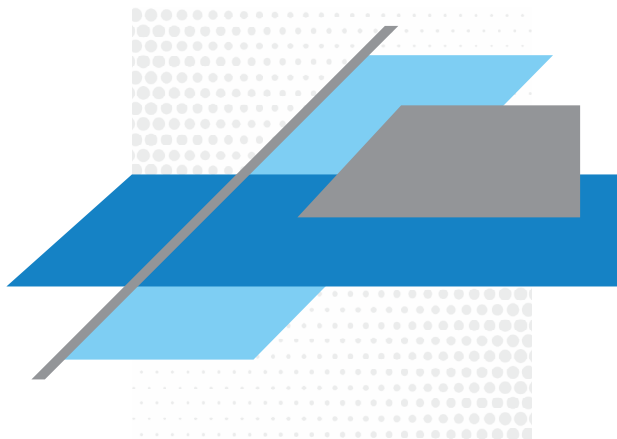
Children	Adults	Interpretation
$IP_{sample} > 0,9$	$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,8 \leq IP_{sample} \leq 0,9$	$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,8$	$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



Ascaris lumbricoides IgG

ELISA kit for the qualitative detection of IgG
antibodies to *Ascaris lumbricoides*

Instructions for use



IVD

REF
EI-601

Σ 96
tests

CE

EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG

ELISA kit for the qualitative detection of
IgG antibodies to *Ascaris lumbricoides*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» is ELISA kit intended to qualitatively detect anti-*Ascaris lumbricoides* IgG in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose lumbricosis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: children, rural people, summer visitors.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Ascaris lumbricoides is a human parasite resulting in lumbricosis — one of the most common helminthiases in the world. By some estimates, over a milliard of people infested with acaricides are on earth.

Human ascaris belongs to *Nematoda* roundworms infesting the small intestine of a man who is its exclusive host. *Ascaris lumbricoides* eggs are excreted in the environment with faeces of the infested man. In a warm, wet soil, ascaris larvae develops in the eggs, therefore eggs become invasive only after a maturation period (2 to 3 weeks at 25–30 °C, lower temperatures require longer term). After infestation, larvae leave eggs in the human intestine, penetrates blood circulation and migrate to the liver and lungs with blood flow. The larvae move to the pharynx from the lungs, and here they are re-ingested and further enter the small intestine. In 2 to 3 months, adult ascaris able to propagate develops from larvae in the small intestine.

The helminths are transferred by faecal-oral route upon injection of mature eggs of *Ascaris lumbricoides* with soil-contaminated vegetables, fruits, water, as well as through dirty hands after contact with soil. Lumbricosis is conditionally divided into the early stage (migration of larvae) and late stage (parasitism of adults in the intestine). Invasion is asymptomatic in most cases. Primary feeling of being unwell occurs as early as several days after infestation and is accompanied by weakness, abdominal pain, nausea. Migration of larvae to the lungs may manifest as rales and cough. In some cases, intense invasion may result in pneumonia and liver damage. However, the most common symptom of early lumbricosis are allergic reactions due to hypersensitivity to metabolic products of larvae.

Late stage manifests as decreases appetite, abdominal pain, vomiting, diarrhoea, constipation. Massive ascaris invasion may result in the intestinal obstruction with a lump of helminths or rupture of the walls with peritonitis. When ascarides penetrate other organs, complications may develop such as

hepatitis, cholangitis, pancreatitis and even asphyxia. Cases of neurological disorders sometimes develop in lumbricosis, namely: headache, irritability, sleep impairment, inattention, etc. If no timely treatment is started for intense invasion, it may lead to death, especially in younger children.

Strong immune response to *Ascaris lumbricoides* invasion develops as early as at the early stage. It includes cellular and humoral immunity. Antigens of ascaris larvae stimulate secretion of all-class specific immunoglobulins, however, the level of specific and total IgE antibodies is the highest. The intensity of the immune response (including increased IgG titres) correlates with the massiveness of the invasion.

For diagnosis of lumbricosis, parasitologic stool test for presence of ascaris larvae and eggs is the most common. X-ray imaging of the lungs is additionally applied at the early stage of invasion. Complete blood count (eosinophilia develops in lumbricosis) and detection of serum anti-*Ascaris lumbricoides* antibodies also is included in the set of exams. The presence of specific anti-ascaris antibodies may suggest asymptomatic invasion, and allows initiation of treatment before complications develop in conjunction with other diagnostic instruments.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Ascaris lumbricoides* IgG in «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Antigens of *Ascaris lumbricoides* larvae are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Ascaris lumbricoides* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS

1 x 96
wells

Microplate

Each plate well is coated with *Ascaris lumbricoides* antigen. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months

		Positive control
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
		TMB solution (ready to use)
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
		Washing solution TWEEN (20x concentrated)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
		Stop Solution (ready to use)
SOLN STOP	1 x 13 ml	0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI Ascaris lumbricoides IgG» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;

- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;

- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.
- 9.2. Fill in the sample application plan.
- 9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.
- 9.4. Add 90 µL of [DIL|SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
[CONTROL|+] – into well A1,
[CONTROL|-] – into wells B1, C1 and D1,
and test samples into the remaining wells.
At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
– aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
– add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
– aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
– repeat the washing step 4 more times;
– after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added

in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\bar{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}}/CO, \text{ where } OD_{\text{sample}} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +

 $OD \geq 1,0$

CONTROL -

 $OD \leq 0,150$

CONTROL -

 $\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0$ where Ncn is the OD for each Nc run

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 24 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
547	0,504	1,43	2,9
671	0,753	2,13	3,6
413	1,165	3,30	3,1

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
547	0,534	1,55	5,0
671	0,750	2,17	4,6
413	1,159	3,36	3,6

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To evaluate clinical sensitivity and specificity of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kits, 55 serum samples from patients with clinical symptoms typical for lumbricosis and 60 serum samples from patients without clinical manifestations (seronegative in terms of *Ascaris lumbricoides*) were used. Clinical sensitivity of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kits was 94.55 % and clinical specificity — 93.3 %.

Method characteristics in comparison with equal commercial ELISA kit was studied in target paediatric population (160 samples) and population of donors (346 samples). For paediatric population serum, relative specificity of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kits was established at the level of 97.92 % and percent agreement was 95.51 %. For donor population serum, relative specificity of was 89.74 %, relative specificity — 96.30 % and percent agreement was 95.47 %.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit supports presence of anti-*Ascaris lumbricoides* specific IgG antibodies. Presence of this class antibodies in newborns is not an evidence of *Ascaris lumbricoides* invasion.

Inconclusive results may suggest a history of *Ascaris lumbricoides* invasion.

Negative result of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit supports the absence of anti-*Ascaris lumbricoides* IgG specific antibodies in the test sample or concentration of specific antibodies is below the sensitivity limit of the assay.

The results of serological test only are not the basis for final diagnosis. When establishing the diagnosis, the results of complex laboratory and instrumental tests, as well as clinical manifestations should be considered. Cross-reactions with antibodies to antigens of other helminths cannot be fully ruled out.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. CDC - Ascariasis // <https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/index.html>.
2. Cooper P. J., Chico M. E. et al. Human Infection with *Ascaris lumbricoides* Is Associated with a Polarized Cytokine Response // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2003. - Vol. 182 (4). - P. 1207–1213.
3. Gupta S., Kumar S. et al. *Ascaris lumbricoides*: an unusual aetiology of gastric perforation // *Journal of Surgical Case Reports*. - 2012. - Vol. 2012. - rjs008.
4. Li Q., Zhao D. et al. Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature // *World Journal of Emergency Medicine*. - 2014. - Vol. 5 (3). - P. 165–170.
5. McSharry C., Xia Y. et al. Natural Immunity to *Ascaris lumbricoides* Associated with Immunoglobulin E Antibody to ABA-1 Allergen and Inflammation Indicators in Children // *Infection and Immunity*. - 1999. - Vol. 67(2). - P. 484–489.
6. Palmer L. J., Celedón J. C. et al. *Ascaris lumbricoides* Infection Is Associated with Increased Risk of Childhood Asthma and Atopy in Rural China // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. - 2002. - Vol. 165, No. 11. - P. 1489–1493.
7. Shalaby N. Effect of *Ascaris lumbricoides* infection on T helper cell type 2 in rural Egyptian children // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. - 2016. - Vol. 12. - P. 379–385.
8. WHO. Water related diseases: ascariasis. 2013 // http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/ascariasis/en/.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 8, 10.02.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.

Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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



ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL][+], B1, C1, D1 – [CONTROL][-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells
(green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

$\overline{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL][-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

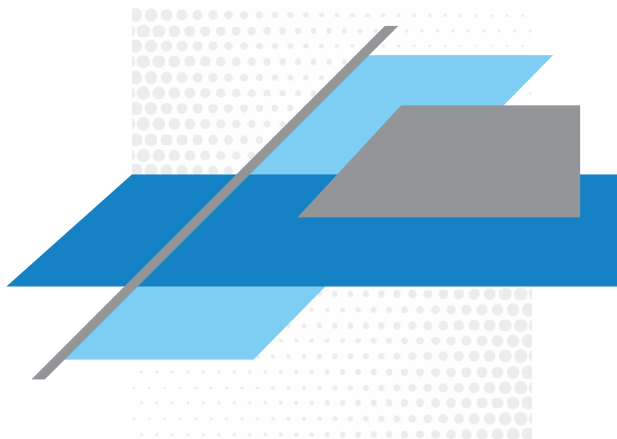
$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



Toxocara canis IgG

ELISA kit for the qualitative detection of IgG
antibodies to *Toxocara canis*

Instructions for use



IVD

REF
EI-603

Σ 96
tests

CE

EQUI *Toxocara canis* IgG

ELISA kit for the qualitative detection of
IgG antibodies to *Toxocara canis*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Toxocara canis* IgG» is ELISA kit intended to qualitatively detect anti-*Toxocara canis* IgG in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose toxocariasis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: children, pet owners, rural people, summer visitors, forest guards, veterinarians.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Toxocariasis is a common disease induced by *Toxocara* helminth which is transmitted from animals to human. Toxocariasis is spread throughout the world, however, it is more common in depressed areas with poor hygienic conditions. In some regions, up to 90 % of puppies and up to 10 % of adult domesticated dogs are infested with toxocara. The risk of infestation is higher for owners of cats and dogs and for children due to playing in the sandpits and on the playgrounds contaminated with animal faeces.

Toxocara are threadworms belonging to *Nematoda*. Human conditions are mostly caused by *Toxocara canis*, which infested canids, rare - *Toxocara cati*, which is more common in felids. Adult toxocara in the body of infested animals reaches 5–15 cm in length; their propagation takes place here. Female helminths lay about 200 thous eggs daily, which are excreted in the environment with faeces. If conditions are favourable, following several weeks of maturation in the soil they become invasive — a larva is developed in the eggs. In the paratenic host (mice, poultry, cows, pigs, etc.). larva develops without propagation. If the conditions are unfavourable, larvae are encapsulated and may maintain viability for a long time (up to 10 years). They may also be the source of invasion.

People are infested through faecal-oral route when ingesting *Toxocara canis* mature eggs with soil-contaminated vegetables, fruits, berries, via dirty hands or when consuming meat of paratenic hosts. In the small intestine, larvae leave their cover and penetrates blood circulation through the intestinal walls. The larvae migrate to other organs and tissues with blood, namely: liver, lungs, muscles, eyes, CNS, etc. In the most of the infested, toxocariasis is asymptomatic. Clinical manifestations of this disease are associated with the site of larvae migration and depend on the intensity of invasion and age of the host. Visceral syndrome larva migrans is typical after infestation of the internal organs with *Toxocara canis* and ocular

toxocariasis, when eye and optic nerve are involved. Symptoms of visceral toxocariasis: fever, fatigue, abdominal pain, anorexia, hepatomegaly, cough and others. Heart and respiratory failure may develop in severe cases. Due to a strong immune response to larvae antigens, immediate and delayed hypersensitivity reactions develop. Granulomatosis in ocular toxocariasis may result in retinal detachment and loss of vision.

Diagnosis of toxocariasis is complicated due to the lack of specific manifestations of the disease, even upon intense invasion. Furthermore, a man is an intermediate host of *Toxocara canis* and does not excrete parasites in the environment, whereas it is difficult to localise larvae in certain organs via non-invasive methods. Eosinophilia may appear in blood tests, however, serological tests are more common to detect toxocariasis (immunofluorescence reaction, ELISA and immunoblotting). Detection of specific anti-*Toxocara canis* IgG to larvae antigens may suggest current or previous invasion. High titer of IgE antibodies is also typical for active invasion. However, the combination of clinical manifestations and laboratory findings are necessary for diagnosis.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Toxocara canis* IgG in «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Antigens of *Toxocara canis* larvae are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Toxocara canis* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS

1 x 96 wells

Microplate

Each plate well is coated with *Toxocara canis* larval antigens. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months

		Positive control
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
		TMB solution (ready to use)
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
		Washing solution TWEEN (20x concentrated)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
		Stop Solution (ready to use)
SOLN STOP	1 x 13 ml	0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI Toxocara canis IgG» ELISA kit;

- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.
- 9.2. Fill in the sample application plan.
- 9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.
- 9.4. Add 90 µL of [DIL][SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
[CONTROL +] – into well A1,
[CONTROL -] – into wells B1, C1 and D1,
and test samples into the remaining wells.
At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
– aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
– add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
– aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
– repeat the washing step 4 more times;
– after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN][CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN][TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN][STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN][TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is impossible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN][TMB] and [SOLN][STOP] must be added

in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\bar{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where: } OD_{sample} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +

 $OD \geq 1,0$

CONTROL -

 $OD \leq 0,150$

CONTROL -

 $\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0$ where Ncn is the OD for each Nc run

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 24 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
669	0,927	2,81	4,8
544	1,503	4,56	1,4
666	1,694	5,14	4,5

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
669	1,016	3,04	4,7
544	1,516	4,54	1,9
666	1,683	5,04	4,1

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To evaluate diagnostic characteristics of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kits, 78 serum samples from patients with clinical symptoms typical for toxocariasis and 60 serum samples from patients without clinical manifestations (seronegative in terms of *Toxocara canis*) were used. Clinical sensitivity of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kits was 98.7 %, clinical specificity — 96.7 %.

Method characteristics in comparison with equal commercial ELISA kit was studied in target paediatric population (160 samples) and population of donors (298 samples). For paediatric population serum, relative specificity of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kits was established at the level of 99.28 % and percent agreement was 97.45 %. For donor population serum, relative specificity of was 89.19 %, relative specificity — 93.55 % and percent agreement was 91.73 %.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit supports presence of anti-*Toxocara canis* specific IgG antibodies. Presence of this class antibodies in newborns is not an evidence of *Toxocara canis* invasion.

Inconclusive results may suggest a history of *Toxocara canis* invasion.

Negative result of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit supports the absence of anti-*Toxocara canis* specific IgG antibodies in the test sample or concentration of specific antibodies is below the sensitivity limit of the assay.

The results of serological test only are not the basis for final diagnosis. When establishing the diagnosis, the results of complex laboratory and instrumental tests, as well as clinical manifestations should be considered. Cross-reactions with antibodies to antigens of other helminths cannot be fully ruled out.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Cobzaru R. G., Rîpă C. et al. Correlation between asthma and *Toxocara canis* infection // *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. - 2012. - Vol. 116(3). - P. 727–730.
2. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2003. - Vol. 16, No. 2. - P. 265–272.
3. Havasiová-Reiterová K., Tomašovicová O. and Dubinský P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice // *Parasitology Research*. - 1995. - Vol. 81. - P. 13–17.
4. Iddawela D., Ehambaram K., and Bandara P. Prevalence of *Toxocara* antibodies among patients clinically suspected to have ocular toxocariasis: A retrospective descriptive study in Sri Lanka // *BMC Ophthalmology*. - 2017. - Vol. 17. - 6 p.
5. Maizels R. M. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion // *Veterinary Parasitology*. - 2013. - Vol. 193 (4). - P. 365–374.
6. Magnaval J.-F., Glickman L. T. et al. Highlights of human toxocariasis // *Korean Journal of Parasitology*. - 2001. - Vol. 39 (1). - P. 1–11.
7. McGuinness S. L., Leder K. Global Burden of Toxocariasis: A Common Neglected Infection of Poverty // *Current Tropical Medicine Reports*. - 2014. - Vol. 1 (1). - P. 52–61.
8. Núñez C. R., Mendoza Martínez G. D. et al. Prevalence and Risk Factors Associated with *Toxocara canis* Infection in Children // *The Scientific World Journal*. - Volume 2013. - Article ID 572089. - 4 p.
9. Okulewicz A., Perec-Matysiak A. et al. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores // *Helminthologia*. - 2012. - Vol. 49. - P. 3–10.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4. Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 8, 04.04.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.

Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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



ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells
(green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

$\bar{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

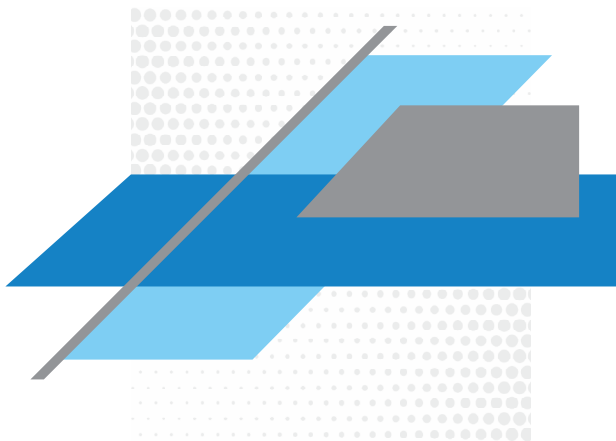
$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE



anti-Lamblia

ELISA kit for the qualitative detection of antibodies
to *Giardia lamblia (intestinalis)*

Instructions for use



IVD

REF
EI-606

Σ 96
tests

CE

EQUI anti-Lamblia

ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to
do *Giardia lamblia (intestinalis)*

1. INTENDED USE

The «EQUI anti-Lamblia» is ELISA kit intended to qualitatively detect antibodies to *Giardia lamblia (intestinalis)* in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to diagnose giardiasis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: children, pet owners, citizens of rural areas, summer house owners.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Giardiasis is considered one of the most common parasitic diseases of the small intestine in the world. This infection is a major cause of acute and chronic diarrhea, especially in children. The etiological agent of giardiasis is *Giardia lamblia*, which is also called *Giardia intestinalis* or *Giardia duodenalis*.

Giardia lamblia are unicellular flagellate protozoa that parasitize in the intestines of humans and some other mammals. During the life cycle of these parasites, two stages alternate: cysts, resistant to external conditions, and a vegetative form - trophozoites. Infection occurs when cysts enter the human gastrointestinal tract. After experiencing the effects of gastric acid, cysts in the duodenum turn into trophozoites, which parasitize in the upper parts of the small intestine. They absorb nutrients from the intestinal lumen, block parietal digestion and disrupt the motility of the intestine.

Humans get infected via fecal-oral routes through cyst-contaminated food, water, unwashed hands, and so on. *Giardia* can also be transmitted to humans from infected cats, dogs, and livestock. Giardiasis is especially common in regions with poor sanitation. In addition, human-to-human transmission is common in preschools.

In many cases, the invasion of *Giardia* occurs without clinical manifestations. In other cases, the first symptoms of giardiasis appear in 1-3 weeks after infection. They are most often manifested by spasms, bloating, nausea and diarrhea, which leads to dehydration and weight loss. The acute form of the disease can last up to two weeks and end in recovery without additional treatment or become chronic. Chronic giardiasis develops when the duration of the invasion is longer than 2 month and the exacerbation of clinical manifestations (diarrhea) is cyclical. *Giardia lamblia* parasitism can lead to malabsorption syndrome, which disrupts the absorption of carbohydrates and fats, as well as the metabolism of vitamins B12, A and C.

Immune response to invasion and non-immune factors are important to control the development of the disease and the severity of clinical manifestations. Both

humoral and cellular immunity play the part in the eradication of the pathogen, the role of which is still subjected to scientific research. In addition, partial resistance to re-infection is formed due to protective mechanisms of the body.

Typically, to diagnose giardiasis, the duodenal contents and feces are examined for trophozoites and cysts of giardiasis. In case of the chronic course of the disease, cysts get excreted periodically, and, considering this, the additional tests should be performed regularly for several weeks. Another method of diagnosing giardiasis is to detect *Giardia lamblia* antigens in the feces. However, serodiagnosis with the detection of specific antibodies to *Giardia* antigens is an important step in assessing the immune response of patients. Detection of specific IgM antibodies suggests an acute stage of giardiasis. However, the detection of specific IgG and IgA antibodies should be interpreted with caution: in some regions they persist for a long time after infection, while in others their level decreases after eradication of the pathogen.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for *Giardia lamblia* specific antibodies in «EQUI anti-Lamblia» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Recombinant *Giardia lamblia* antigens are entrapped in the wells. During the first step of incubation of the test samples in the wells of the ELISA plate, *Giardia lamblia*-specific antibodies, if present in the samples, bind to the solid phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species (anti-IgG and anti-IgA) monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

		Microplate
		Each plate well is coated with <i>Giardia lamblia</i> purified antigens. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
STRIPS	1 x 96 wells	
		Positive control
CONTROL +	1 x 0,35 ml	Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 1,2 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C

DIL SAMPLE	1 x 11 ml	Serum dilution solution Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (purple). Store at 2-8 °C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG and IgA, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	Washing solution TWEEN (20x concentrated) 20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
SOLN STOP	1 x 13 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI anti-Lambli» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;

- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI anti-Lambliа» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a

temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame.

Be sure to add control wells in every test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Add 80 µL of **DIL|SAMPLE** into each plate well.

9.5. Add 20 µL of controls and test samples into the wells:

CONTROL|+ – into well A1,

CONTROL|- – into wells B1, C1 and D1,

and test samples into the remaining wells.

At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.

- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
- aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 - add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 - aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 - repeat the washing step 4 more times;
 - after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +	OD $\geq 1,0$
CONTROL -	OD $\leq 0,150$

CONTROL -	$\bar{Nc} \times 0,5 \leq N_{cn} \leq \bar{Nc} \times 2,0$	where N_{cn} is the OD for each N_c run
-----------	--	--

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and N_c is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristic

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
14L	0,679	2,47	6,5
16L	0,490	1,79	6,6

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 3 days in 3 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
14L	0,670	2,39	5,55
16L	0,463	1,65	7,06

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 μ mol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

Studies of the characteristics of the method in comparison with a similar commercial ELISA kit were performed on a sample of characterized sera, the target group of children and a group of donors. The relative sensitivity of «EQUI anti-Lamblia» ELISA kits was determined from a group of 23 serum samples that were tested for antibodies to *Giardia lamblia* and characterized as positive in a commercial ELISA kit. All sera were also determined to be positive in «EQUI anti-Lamblia» kits, so the relative sensitivity equals 100%. For 148 serum samples of children that were tested and characterized in commercial analogues, the relative specificity of «EQUI anti-Lamblia» ELISA kits was 92.86%, the percentage of coincidence - 93.24%. According to a similar principle, for 238 serum samples of donor blood, the relative specificity was 97% and the percentage of coincidence was 96.64%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

The final diagnosis cannot be made solely on the basis of serological test results, since clinical manifestations of the disease and laboratory data (such as the detection of cysts in faecal samples or trophozoites in duodenal contents; the results of detection of *Giardia lamblia* antigen in faeces) should be taken into account as well.

Additionally, cross-reactions with antibodies to antigens of other parasites cannot be completely ruled out.

Giardia lamblia-specific antibodies may not be detected in case of children with persistent and prolonged giardiasis.

It should be noted that IgG antibodies to *Giardia lamblia* can be detected via ELISA for a long time, even after successful treatment.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
High background in all wells	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
High background in a row of wells	

Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Adam R. D. Biology of *Giardia lamblia* // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2001. - Vol. 14(3). - P. 447–475.
2. CDC - *Giardia* // <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/index.html>.
3. Choy S. H., Al-Mekhlafi H. M. et al. Prevalence and Associated Risk Factors of *Giardia* Infection among Indigenous Communities in Rural Malaysia // *Scientific Reports*. - 2014. - Vol. 4, Article number: 6909.
4. DuPont H. L. *Giardia*: both a harmless commensal and a devastating pathogen // *Journal of Clinical Investigation*. - 2013. - Vol. 123(6). - P. 2352–2354.
5. Faubert G. Immune Response to *Giardia duodenalis* // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2000. - Vol. 13(1). - P. 35–54.
6. Lopez-Romero G., Quintero J. et al. Host defences against *Giardia lamblia* // *Parasite Immunology*. - 2015. -Vol. 37(8). - P. 394–406.
7. Saghaug C. S., Sørnes S. et al. Human Memory CD4+ T Cell Immune Responses against *Giardia lamblia* // *Clinical and Vaccine Immunology*. - 2016. - Vol. 23, No. 1. - P. 11–18.
8. Solaymani-Mohammadi S. and Singer S. M. *Giardia duodenalis*: The Double-edged Sword of Immune Responses in Giardiasis // *Experimental Parasitology*. - 2010. - Vol. 126 (3). - P. 292–297.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 7, 18.02.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.



Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 80 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(purple)

Add to 20 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL][+], B1, C1, D1 – [CONTROL][-],
other wells – examined samples
(change of colour from purple to blue)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells
(green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

Nc - the average value of OD 3-x [CONTROL][-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

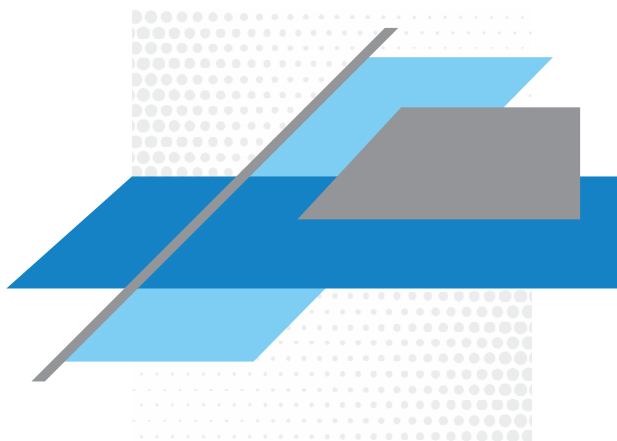
IP _{sample} > 1,1	POSITIVE
0,9 ≤ IP _{sample} ≤ 1,1	BORDERLINE
IP _{sample} < 0,9	NEGATIVE



Borrelia burgdorferi IgG

ELISA kit for the qualitative and semiquantitative
detection of IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi*

Instructions for use



IVD

REF
EI-801

Σ 96
tests



EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG

ELISA kit for the qualitative and semiquantitative detection of IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG» ELISA is a kit intended to qualitatively and semi-quantitatively detect anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato IgG in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose Lyme disease. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated open immunoassay analysers.

Target group: patients with non-specific infectious symptoms, people who spend lots of time outdoors in wooded, grassy areas or tick bites, inhabitants of endemic areas.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Lyme disease, or Lyme borreliosis, is the most common bacterial infection in the northern hemisphere that is transmitted through the bite of Ixodes mites. Spirochetes of the genus *Borrelia* cause this disease. Lyme disease causes polysystemic affections and without proper treatment in the chronic form causes a number of complications.

Lyme borreliosis is caused by several species and serotypes of bacteria in North America, Europe and Asia, which are grouped into the group *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The most common are *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*. These are mobile gram-negative spiral spirochetes 10-25 µm long and about 0.2 µm thick.

After infection with *Borrelia*, an inflammatory reaction occurs in response to surface antigens of *Borrelia burgdorferi*. The development of primary migratory erythema is associated with the interaction of mast cells with lipoproteins of the pathogen. During the first stage of the disease, 1-3 weeks after infection, specific IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* antigens begin to be produced. They are found in the vast majority of people with a history of primary migratory erythema and tick bites. Specific IgG antibodies begin to be synthesized about a month after infection and are detected in high titers in the second stage of Lyme disease, as well as in chronic borreliosis in the absence of proper treatment. After successful therapy, the titer of IgG antibodies decreases after a few months, but they may continue to be low for a long time. The presence of specific antibodies to *Borrelia burgdorferi* antigens does not provide immunity to re-infection.

Asymptomatic course of the disease in the early stages, as well as nonspecific manifestations of tick-borne borreliosis complicate its timely detection. The detection of specific antibodies plays a special role to *Borrelia* antigens in serum or cerebrospinal fluid by ELISA and immunoblotting. However, false-positive results of serodiagnosis can be observed in the presence of other spirochert infections

(syphilis, leptospirosis, etc.). Bacteriological methods of detection of the pathogen and its genetic material by polymerase chain reaction are used to verify the diagnosis. In addition, there is a seronegative course of the disease. Therefore, when diagnosing Lyme borreliosis, both the data of the epidemiological anamnesis and the clinical picture of the infection are taken into account.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Borrelia burgdorferi* specific IgG in «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS	1 x 96 wells	Microplate
		Each plate well is coated with anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato: <i>B.burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B.afzelii</i> , <i>B.garinii</i> . The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Positive control
		Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative control
		Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Serum dilution solution
		Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (violet). Store at 2-8 °C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Conjugate solution (ready to use)
		Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C

SOLN|TMB

1 x 13 ml

TMB solution (ready to use)

TMB solution, H_2O_2 , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C

Washing solution TWEEN (20x concentrated)

20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days

TWEEN|WASH|20x

1 x 50 ml

SOLN|STOP

1 x 13 ml

Stop Solution (ready to use)

0.5 mol H_2SO_4 solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 μL , tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620-695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use reagents from different lots of the ELISA kit during the assay; do not mix reagents from different lots of the ELISA kit; do not mix reagents from ELISA kits of different nosology; do not use reagents of other manufacturers along with «EQUI Borrelia burgdorferi IgG» kits;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA ki;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for **SOLN|CONJ** and **SOLN|TMB**;
- do not evaluate the test results visually (without a reader);

- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls of ELISA kit «EQUI Borrelia burgdorferi IgG» were tested and found to be 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;
- some components of the ELISA kit contain low concentrations of harmful agents and could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact with [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with skin or mucosa the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;
- in case of spilling solutions that do not contain acid, e.g. sera, disinfect the surface thoroughly, then dry it with absorbent paper. If the spilling fluid is an acid, it must be initially neutralized with sodium bicarbonate and then use the mechanism described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame.

Be sure to add control wells in every test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Dispense 90 µl of **DIL|SAMPLE** into each well.

9.5. Add 10 µl of controls and test samples into the wells:

CONTROL|+ – into well A1,

CONTROL|- – into wells B1, C1, D1,

and test samples into the remaining wells.

At the time of adding, colour of the sample diluent changes from violet to blue. Pipette mixture in the wells gently, avoiding foaming.

9.6. Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.

9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 6 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:

- aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
- add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
- aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
- repeat the washing step 5 more times;
- after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.

9.8. Add 100 µl of [SOLN|CONJ] into all wells. Cover strips with a new adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.

9.9. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times as described above in 9.7.

9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.

9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.

9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.

9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD of the negative control ($\bar{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL + OD $\geq 1,5$

CONTROL - OD $\leq 0,150$

CONTROL - $\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \times 2,0$ where Ncn is the OD for each Nc run

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE

* Borderline samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

Use of the positivity index allows for a semi-quantitative comparative analysis of the level of specific antibodies in the dynamics of paired samples obtained from patients with an interval of 2-4 weeks. It should be borne in mind that IP_{sample} within 1,1 – 7,0 proportional to the content of specific antibodies. If IP_{sample} is higher 7,0, to correctly assess the content of specific antibodies, it is recommended to re-analyze the sample previously diluted 10 times. When determining the final result in this case, multiply the value obtained IP_{sample} on the degree of dilution (x10).

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
2	0,449	1,3	7,2
13	0,675	2,0	7,1

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
2	0,414	1,2	7,8
13	0,714	2,1	6,9

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To determine the sensitivity and specificity of the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG» ELISA kit in comparison with a similar commercial ELISA kit, 122 samples of donor blood sera (random sampling) and 212 samples of children's blood sera (a total of 334 samples), as well as samples of a commercial panel of sera, were used «Lyme Disease (Anti-*Borrelia burgdorferi*) Mixed Titer Performance Panel PTL202» (SeraCare Life Sciences, USA). The results of determination of antibodies of the IgG class to *Borrelia burgdorferi*, obtained in the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG» ELISA kit, were compared with the results obtained in similar commercial tests. The relative sensitivity of the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG» ELISA kit was 99.5%, the relative specificity was 98.8%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

A positive result in the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgG» ELISA kit is evidence of the presence of IgG class antibodies in the patient, specific to *Borrelia burgdorferi* sensu lato, which are produced by the body when a person is infected with the causative agent of Lyme borreliosis.

It should be noted that in the case of early infection, the ELISA result may be negative due to the absence of antibodies at the initial stage of the disease. In the presence of clinical manifestations of the disease, it is recommended to conduct repeated testing after two to four weeks, as well as examine the patient's sample for specific antibodies of the IgM class (for example, in the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit).

It is not possible to completely exclude false-positive results, which may be caused by the presence of specific antibodies in the blood in diseases caused by spirochetes (syphilis, typhus, leptospirosis, etc.).

To confirm a positive ELISA result, it is recommended to conduct an additional study of the sample for the presence of antibodies to individual *Borrelia burgdorferi* proteins by immunoblotting. However, the final diagnosis cannot be established only on the basis of serological test results. For the correct diagnosis of tick-borne borreliosis, research should also be conducted to identify the causative agent, for example, using PCR or cultural methods. When establishing a diagnosis, the results of a complex of laboratory and instrumental studies, as well as clinical manifestations of the disease, should be taken into account.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Bernard Q., Wang Z. et al. Interaction of primary mast cells with *Borrelia burgdorferi* (sensu stricto): role in transmission and dissemination in C57BL/6 mice // *Parasites & Vectors*. - 2017. - 10:313.
2. CDC. Lyme Disease // <https://www.cdc.gov/lyme/index.html>.
3. Cerar T., Strle F., Stupica D. et al. Differences in Genotype, Clinical Features, and Inflammatory Potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Strains from Europe and the United States // *Emerging Infectious Diseases*. - 2016. - Vol. 22(5). - P. 818-827.
4. Embers M. E., Hasenkampf N. R. et al. Dynamic Longitudinal Antibody Responses during *Borrelia burgdorferi* Infection and Antibiotic Treatment of Rhesus Macaques // *Clinical & Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19, No. 8. – P. 1218-1226.
5. Lantos P. M., Auwaerter P. G., Wormser G. P. A Systematic Review of *Borrelia burgdorferi* Morphologic Variants Does Not Support a Role in Chronic Lyme Disease // *Clinical Infectious Diseases*. - 2014. - Vol. 58(5). - P. 663–671.
6. Lyme Borreliosis (Lyme disease). In: *International travel and health*. Geneva: World Health Organization; 2014 (<http://www.who.int/ith/diseases/lyme/en/>).
7. Tilly K., Rosa P. A. and Stewart P. E. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi* // *Infectious Disease Clinics of North America*. - 2008. - Vol. 22(2). - P. 217–234.
8. Shapiro E. D. *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease) // *Pediatrics in Review*. - 2014. - Vol. 35(12). - P. 500–509.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Mark of compliance with technical regulations

Edition 7, 13.12.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

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

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

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells (green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at 450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

$\bar{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL][-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

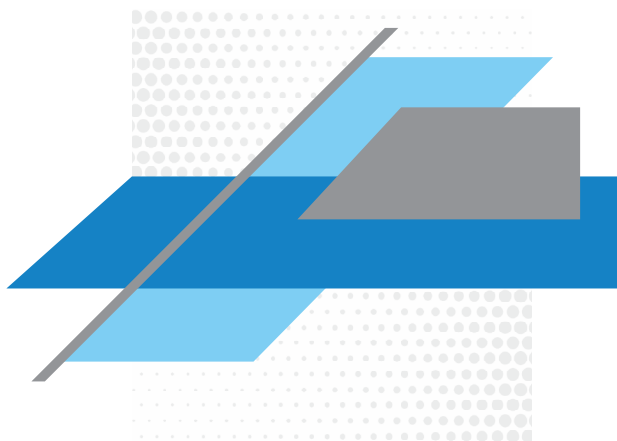
$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE



Borrelia burgdorferi IgM

ELISA kit for the qualitative detection of IgM
antibodies to *Borrelia burgdorferi*

Instructions for use



IVD

REF
EI-802

Σ 96
tests



EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM

ELISA kit for the qualitative detection of IgM
antibodies to *Borrelia burgdorferi*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit is intended for the qualitative detection of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in human serum or blood plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the purpose of diagnosing acute Lyme borreliosis. The analysis procedure is designed both for manual setup with automatic pipettes and standard equipment, and for an automatic enzyme immunoassay of the «open» type.

Target group: patients with non-specific infectious symptoms, visits to the forest or a history of tick bites, summer residents, residents of endemic areas.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Lyme disease, or Lyme borreliosis, is the most common bacterial infection in the northern hemisphere that is transmitted through the bite of Ixodes mites. Spirochetes of the genus *Borrelia* cause this disease. Lyme disease causes polysystemic affections and without proper treatment in the chronic form causes a number of complications.

Lyme borreliosis is caused by several species and serotypes of bacteria in North America, Europe and Asia, which are grouped into the group *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The most common are *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*. These are mobile gram-negative spiral spirochetes 10-25 µm long and about 0.2 µm thick.

After infection with *Borrelia*, an inflammatory reaction occurs in response to surface antigens of *Borrelia burgdorferi*. The development of primary migratory erythema is associated with the interaction of mast cells with lipoproteins of the pathogen. During the first stage of the disease, 1-3 weeks after infection, specific IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* antigens begin to be produced. They are found in the vast majority of people with a history of primary migratory erythema and tick bites. Specific IgG antibodies begin to be synthesized about a month after infection and are detected in high titers in the second stage of Lyme disease, as well as in chronic borreliosis in the absence of proper treatment. After successful therapy, the titer of IgG antibodies decreases after a few months, but they may continue to be low for a long time. The presence of specific antibodies to *Borrelia burgdorferi* antigens does not provide immunity to re-infection.

Asymptomatic course of the disease in the early stages, as well as nonspecific manifestations of tick-borne borreliosis complicate its timely detection. The detection of specific antibodies plays a special role to *Borrelia* antigens in serum or cerebrospinal fluid by ELISA and immunoblotting. However, false-positive results of serodiagnosis can be observed in the presence of other spirochete infections (syphilis, leptospirosis, etc.). Bacteriological methods of detection of the pathogen

and its genetic material by polymerase chain reaction are used to verify the diagnosis. In addition, there is a seronegative course of the disease. Therefore, when diagnosing Lyme borreliosis, both the data of the epidemiological anamnesis and the clinical picture of the infection are taken into account.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato specific IgM in «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgM monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

		Microplate
STRIPS	1 x 96	Each plate well is coated with anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato: <i>B.burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B.afzelii</i> , <i>B.garinii</i> . The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
	wells	
		Positive control
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgM, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C

SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C Washing solution TWEEN (20x concentrated) 20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	
SOLN STOP	1 x 13 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use reagents from different lots of the ELISA kit during the assay; do not mix reagents from different lots of the ELISA kit; do not mix reagents from ELISA kits of different nosology; do not use reagents of other manufacturers along with «EQUI Borrelia burgdorferi IgM» kits;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA ki;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for **SOLN|CONJ** and **SOLN|TMB**;
- do not evaluate the test results visually (without a reader);

- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls of ELISA kit «EQUI Borrelia burgdorferi IgM» were tested and found to be 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;
- some components of the ELISA kit contain low concentrations of harmful agents and could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact with [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with skin or mucosa the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;
- in case of spilling solutions that do not contain acid, e.g. sera, disinfect the surface thoroughly, then dry it with absorbent paper. If the spilling fluid is an acid, it must be initially neutralized with sodium bicarbonate and then use the mechanism described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- 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 a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with

patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Dispense 90 µl of **DIL|SAMPLE** into each well.

9.5. Add 10 µl of controls and test samples into the wells:

CONTROL|+ – into well A1,

CONTROL|- – into wells B1, C1, D1,

and test samples into the remaining wells.

At the time of adding, colour of the sample diluent changes from brown to blue. Pipette mixture in the wells gently, avoiding foaming.

- 9.6. Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 6 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
- aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 - add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 - aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 - repeat the washing step 5 more times;
 - after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100µl of [SOLN|CONJ] into all wells. Cover strips with a new adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
- 9.9. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times as described above in 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for 30 minutes in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD of the negative control ($\bar{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +	OD $\geq 1,5$
CONTROL -	OD $\leq 0,150$

CONTROL -	$\overline{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \overline{Nc} \times 2,0$	where Ncn is the OD for each Nc run
-----------	---	--

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\overline{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Borderline samples are recommended to be tested again in two wells of the ELISA kit. If the results are again indeterminate, a new sample should be collected and analyzed after 7-14 days. In case of repeated reception of indeterminate results, such samples should be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 44 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
269	2,186	7,7	5,6
809	0,387	1,4	8,6

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
269	2,073	7,2	8,1
809	0,364	1,3	7,5

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 μ mol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To determine the sensitivity of the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit, we used serum samples that were characterized as positive by the Western blot method (59 samples), as well as samples of the commercial serum panel «Lyme Disease (Anti-*Borrelia burgdorferi*) Mixed Titer Performance Panel PTL202 (SeraCare Life Sciences, USA). According to the results of the analysis, the sensitivity of the ELISA kit was 96.9%. To assess the specificity, samples of donor blood sera (122 samples) and 212 samples of children's blood sera (334 samples in total) were used. The results of the determination of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* obtained in the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit were compared with the results obtained in similar commercial tests. The relative specificity of the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit was 100.0%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

A positive result in the «EQUI *Borrelia burgdorferi* IgM» ELISA kit is evidence of the presence of IgM class antibodies in the patient, specific to *Borrelia burgdorferi* sensu lato, which are produced by the body when a person is infected with the causative agent of Lyme borreliosis.

It should be noted that in the case of early infection, the ELISA result may be negative due to the absence of antibodies at the initial stage of the disease. In the presence of clinical manifestations of the disease, it is recommended to conduct repeated testing after at least two weeks. A two- or three-fold increase in the level of antibodies indicates the activity of the infectious process.

The results obtained in immunosuppressed individuals should be interpreted with caution.

It is not possible to completely exclude false-positive results, which may be caused by the presence of specific antibodies in the blood in diseases caused by spirochetes (syphilis, typhus, leptospirosis, etc.).

To confirm a positive ELISA result, it is recommended to conduct an additional study of the sample for the presence of antibodies to individual *Borrelia burgdorferi* proteins by immunoblotting. However, the final diagnosis cannot be established only on the basis of serological test results. For the correct diagnosis of tick-borne borreliosis, research should also be conducted to identify the causative agent, for example, using PCR or cultural methods. When establishing a diagnosis, the results of a complex of laboratory and instrumental studies, as well as clinical manifestations of the disease, should be taken into account.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use

Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Bernard Q., Wang Z. et al. Interaction of primary mast cells with *Borrelia burgdorferi* (sensu stricto): role in transmission and dissemination in C57BL/6 mice // *Parasites & Vectors*. - 2017. - 10:313.
2. CDC. Lyme Disease // <https://www.cdc.gov/lyme/index.html>.
3. Cerar T., Strle F., Stupica D. et al. Differences in Genotype, Clinical Features, and Inflammatory Potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Strains from Europe and the United States // *Emerging Infectious Diseases*. - 2016. - Vol. 22(5). - P. 818-827.
4. Embers M. E., Hasenkampf N. R. et al. Dynamic Longitudinal Antibody Responses during *Borrelia burgdorferi* Infection and Antibiotic Treatment of Rhesus Macaques // *Clinical & Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19, No. 8. – P. 1218-1226.
5. Lantos P. M., Auwaerter P. G., Wormser G. P. A Systematic Review of *Borrelia burgdorferi* Morphologic Variants Does Not Support a Role in Chronic Lyme Disease // *Clinical Infectious Diseases*. - 2014. - Vol. 58(5). - P. 663–671.
6. Lyme Borreliosis (Lyme disease). In: *International travel and health*. Geneva: World Health Organization; 2014 (<http://www.who.int/ith/diseases/lyme/en/>).
7. Tilly K., Rosa P. A. and Stewart P. E. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi* // *Infectious Disease Clinics of North America*. - 2008. - Vol. 22(2). - P. 217–234.
8. Shapiro E. D. *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease) // *Pediatrics in Review*. - 2014. - Vol. 35(12). - P. 500–509.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm.
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Mark of compliance with technical regulations

Edition 7, 14.11.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

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

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

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells
(green)

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

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

Nc - the average value of OD 3-x [CONTROL-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE