



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



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:



Директор
Director

Наталія СТЕПАНКІВСЬКА
Natalia STEPANKIVSKA

80141
Сертифікація систем
менеджменту

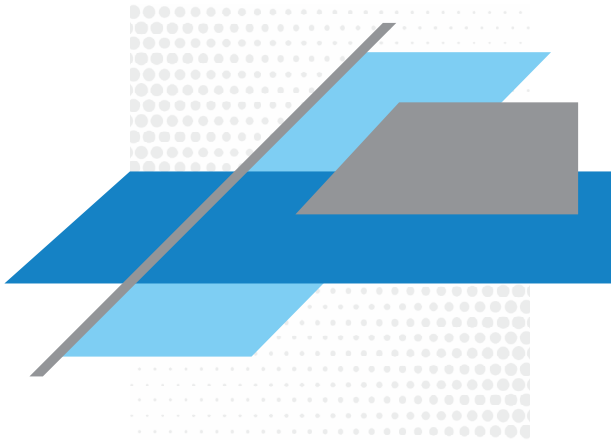
Сертифікат чинний за умови проведення щорічного наглядового аудиту.
Чинність сертифікату необхідно перевірити на офіційному веб-сайті
www.usi.biz.ua або за телефоном: +38-050- 818-7-333
Certificate is valid if the annual surveillance audit has been conducted
The validity of the certificate shall be checked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



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

		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
STRIPS	1 x 96 wells	
		Positive control
		Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
CONTROL +	1 x 0,25 ml	
		Negative control
		Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
CONTROL -	1 x 0,6 ml	
		Serum dilution solution
		Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (violet). Store at 2-8 °C
DIL SAMPLE	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 CONJ	1 x 13 ml	

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 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, 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. 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}).

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

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

10.2. Quality control (assay validation)

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

CONTROL + OD $\geq 1,5$

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
	<i>In vitro</i> 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

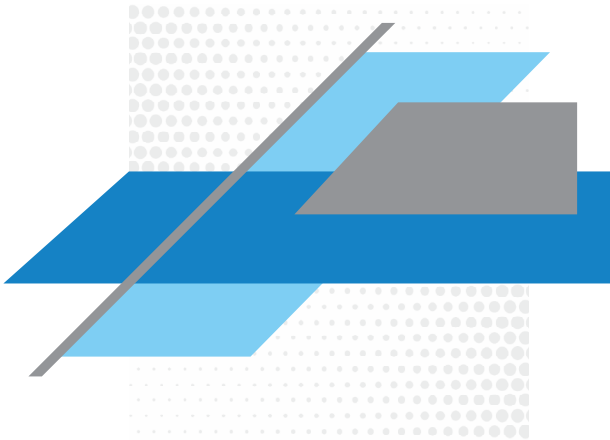
$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE



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

STRIPS	1 x 96 wells	<p>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</p>
CONTROL +	1 x 0,25 ml	<p>Positive control Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C</p>
CONTROL -	1 x 0,6 ml	<p>Negative control Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C</p>
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	<p>Serum dilution solution Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C</p>
SOLN CONJ	1 x 13 ml	<p>Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgM, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C</p>

[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 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, 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. 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}).

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

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

10.2. Quality control (assay validation)

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

CONTROL + $OD \geq 1,5$

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

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

* Borderline samples are recommended to be 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 $\mu\text{mol/L}$), 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
	<i>In vitro</i> 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

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

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

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

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

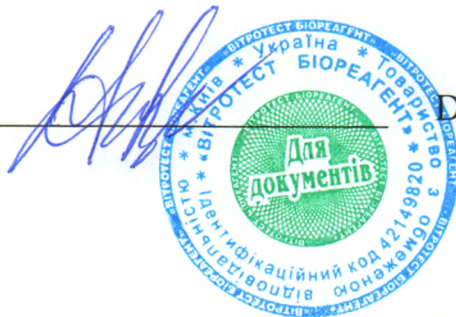
Date: 23.03.2021

STATEMENT

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

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

Signature: _____



Director Ihor Nikolaienko Ph.D





СЕРТИФІКАТ

CERTIFICATE * CERTIFICAT * ZERTIFIKAT * СЕРТИФИКАТ * CERTIFICADO

ОРГАН СЕРТИФІКАЦІЇ СИСТЕМ УПРАВЛІННЯ
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ЗАСВІДЧУЄ, ЩО

СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКІСТЮ

ТОВАРИСТВА З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

Юридична адреса: вул. Бойчука, 18-Б, кв. 56, м. Київ,
01103, Україна
Адреса виробництва: вул. Курортна, 11, м. Київ, 04075, Україна

код ЄДРПОУ 42149820

СТОСОВНО
розроблення та виробництва тест-систем імуноферментних

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

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

Заступник керівника
Органу сертифікації



В.Д. Ример



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

№ 80020
ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1

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

Vitrotest® Bordetella pertussis IgM

Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgM до *Bordetella pertussis*.

TK126
96 аналізів

IVD

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментна тест-система Vitrotest® Bordetella pertussis IgM призначена для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgM, специфічних до *Bordetella pertussis*, у сироватці чи плазмі крові людини.

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

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Кашлюк – небезпечна респіраторна інфекція, спричинена бактерією *Bordetella pertussis*. Характерними проявами захворювання є нападоподібний спастичний кашель, свистячий шум при вдиханні повітря, посткашльове блювання тощо. Найтяжче кашлюк протікає у немовлят і дітей раннього віку - нерідко з зупинкою дихання (апное) та смертельними випадками.

Кашлюк є всесвітньо поширеною хворобою з циклічним перебігом та піками захворюваності кожні 3-5 років. З огляду на тяжкість клінічних проявів в багатьох країнах світу впроваджена вакцинація проти кашлюку. Саме внаслідок широкомасштабної вакцинації, проведеної у 1950-1960 роках у розвинутих країнах, сталося різке зниження захворюваності (більш ніж на 90%) і смертності від кашлюку.

Однак, незважаючи на високий рівень охоплення населення щепленнями, кашлюк залишається проблемою охорони здоров'я в усьому світі: щорічно реєструється приблизно 140000 випадків захворювання.

В Україні відповідно до Національного календаря щеплень, вакцинувати дітей для профілактики кашлюку необхідно у віці 2, 4, 6 і 18 місяців. Для вакцинації дітей проти кашлюку на першому році життя можна використовуватися вакцини як з ацелюлярним (АаКДП), так і з цілюноклітинним (АКДП) кашлюковим компонентом. Сформований в результаті повного курсу вакцинації імунітет проти кашлюку зберігається впродовж 5-7 років.

Для діагностики кашлюку використовують лабораторні методи, серед яких найбільш поширеними є метод полімеразної ланцюгової реакції (виявлення збудника протягом перших 2-3 тижнів хвороби) та імуноферментний аналіз (визначення специфічних антитіл). Виявлення антитіл класу IgM, специфічних до *Bordetella pertussis*, свідчить про гостру інфекцію кашлюку або нещодавно перенесену вакцинацію. Визначення антитіл класу IgG до специфічного для *Bordetella pertussis* токсину (PT) у сироватці крові невакцинованої особи дозволяє діагностувати минулу або поточну інфекцію кашлюку, а також надає інформацію про специфічний імунітет після вакцинації.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Визначення антитіл класу IgM, специфічних до *Bordetella pertussis*, в тест-системі Vitrotest® Bordetella pertussis IgM базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА у двохетапній інкубації. У лунках планшету засорбовані антигени *Bordetella pertussis*. Під час першого етапу інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування, за наявності у зразках, специфічних до *Bordetella pertussis* антитіл з антигенами на твердій фазі. Лунки відмиваються для видалення незв'язаних антитіл, залишаються лише специфічні комплекси антиген-антитіло. Після цього додається кон'югат антивидових анти-IgM моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, які зв'язуються з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Комплекси антиген-антитіло виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 15 min інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту. Оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл у зразку.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ**4.1. Склад набору**

ELISA STRIPS	1x96 лунки	ІФА-планшет У кожній лунці планшету засорбовані антигени <i>Bordetella pertussis</i> . Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунк.
--------------	------------	---

PREDILUTION PLATE	1x96 лунок	Планшет для попереднього розведення зразків
CONTROL -	1x0,5 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий).
CONTROL +	1x0,3 ml	Позитивний контроль Розчин специфічних імуноглобулінів з консервантом (рожевий).
SAMPLE PREDILUENT	1x20 ml	Розчин для попереднього розведення зразків Буферний розчин з детергентом та консервантом (коричнево-зелений)
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Розчин для розведення зразків Буферний розчин з детергентом та консервантом (жовтий)
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Розчин кон'югату Буферний розчин моноклональних антитіл до IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, зі стабілізаторами та консервантом (фіолетовий), готовий до використання.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Розчин для промивання Tw20 (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

Клейка плівка (2), бланк внесення проб (1), інструкція з використання та сертифікат якості.

4.2. Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- Автоматичні піпетки змінного об'єму на 10–1000 μ l та наконечники до них;
- спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 nm;
- мірний лабораторний посуд (10-1000 ml);
- деіонізована або дистильована вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- контейнери для відходів потенційно зараженого матеріалу;
- таймер;
- фільтрувальний папір;
- одноразові рукавички;
- дезінфікуючі засоби;
- захисний одяг.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

5.1. Застереження

Дотримання часу інкубації та температури є надзвичайно важливим для коректного результату ІФА.

- не використовувати компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовувати під час аналізу та не змішувати компоненти різних серій, компоненти з тест-систем різних нозологій або реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

*Примітка: допускається використання **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** та **SAMPLE PREDILUENT** інших серій.*

- після використання реагенту закривати кожен флакон своєю кришкою;
- під час промивання контролювати наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовувати новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

- уникати потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;
- **TMB SOLUTION** має бути безбарвним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникати контакту **TMB SOLUTION** з металами або іонами металів. Для роботи використовувати лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- ні в якому разі не використовувати один і той же посуд для **CONJUGATE SOLUTION** та **TMB SOLUTION**.

Виробник не несе відповідальність за будь-які некоректні результати та несприятливі випадки, що виникли внаслідок порушень вищенаведених застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання спектрофотометра).

5.2. Заходи безпеки

- всі реагенти набору призначені тільки для *in vitro* діагностики та можуть використовуватися тільки кваліфікованим персоналом;
- постановку аналізу проводити лише в захисному одязі, одноразових рукавичках та захисних окулярах;
- не допускається приймати їжу, пити, палити або користуватися косметикою у кімнаті виконання тесту;
- не піпетувати розчини ротом;
- негативний контроль тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis IgM не містить компонентів людського походження;
- позитивний контроль тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis IgM протестований та визнаний негативним на HBsAg та антитіла до ВІЛ, ВГС та *Treponema pallidum*, однак працювати з контролем та досліджуваними зразками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потраплянні **TMB SOLUTION** **STOP SOLUTION** та **CONJUGATE SOLUTION** на слизові оболонки та шкіру необхідно негайно промити уражене місце великою кількістю води;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню дезінфікуючим засобом, а потім витерти насухо фільтрувальним папером. В іншому випадку кислоту спочатку потрібно нейтралізувати розчином бікарбонату натрію, а потім витерти поверхню як описано вище.

5.3. Утилізація відходів

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 h за кімнатної температури, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5 % протягом 30 min, або іншими дозволеними дезінфікуючими засобами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування за температури 121 °C упродовж 1 h;
- не автоклаувати розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- видалення інактивованих відходів проводити згідно з чинним законодавством України;
- видалення решти компонентів тест-систем після використання проводити згідно GLP (good laboratory practice) та чинного законодавства України в сфері поводження з відходами.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати за температури 2-8 °C. Не допускається заморожування тест-системи. Транспортувати набір за температури 2-8 °C. Допускається одноразове транспортування за температурою не вище 23 °C протягом двох днів.

Після першого відкриття первинного пакування компоненти тест-системи є стабільними протягом 3 місяців, окрім тих, що зазначені в п. 8 даної Інструкції.

7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразки сироватки чи плазми (EDTA, літій-гепарин, цитрат натрію, фторид калію) крові зберігати за температури 2-8 °C не більше 3 днів після забору. Для більш тривалого зберігання зразки тримати у морозильній камері за температури від -20 до -70 °C. Заморожені зразки перед використанням розморозити та витримати за кімнатної температури упродовж 30 min. Не використовувати прогріті зразки. Після розморозування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникати повторного заморожування-відтаування досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільнити від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 обертів/мін протягом 10-15 min. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом. На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,21 mg/ml (361,8 µmol/l), гемоглобіну в концентрації до 10 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи за кімнатної температури 18-25 °C протягом 30 min перед використанням!

8.1. Підготовка ІФА-планшета

ELISA STRIPS упаковано під вакуумом з вологопоглиначем.

Для попередження конденсації води в лунках слід відкрити **ELISA STRIPS** лише після витримувannya 30 min за кімнатної температури. Потім розкрити вакуумну упаковку, відокремити необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упаковати з вологопоглиначем та зберігати щільно закритими на замок (zip-lock) за температури 2-8 °C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Приготування розчину для промивання

Для приготування розчину для промивання необхідно розвести концентрат **WASH TWEEN|20X** 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішати. Наприклад, 4 ml концентрату + 76 ml води, що достатньо для 8 лунок. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину для промивання потрібно прогріти флакон за температури 37 °C до повного розчинення кристалів (15 - 20 min). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8 °C не більше 7 днів.

8.3. Попереднє розведення зразків та контролів

Досліджувані зразки та контролі попередньо розвести у 10 разів **SAMPLE PREDILUENT**. Для цього в необхідну кількість лунок **PREDILUTION PLATE** (комплектуються в наборі) внести по 90 µl **SAMPLE PREDILUENT** та додати по 10 µl зразків та контролів. Під час внесення зразків та контролів обережно піпетувати суміш, при цьому колір розчину для попереднього розведення зразків повинен змінитись з коричнево-зеленого на синій.

Після розведення та перенесення зразків використані лунки **PREDILUTION PLATE** необхідно знезаразити шляхом замочування в дезінфікуючому розчині або автоклавуванням.

Процедуру розведення зразків та контролів необхідно проводити безпосередньо перед аналізом.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок **ELISA STRIPS** для аналізу (кількість досліджуваних зразків та 4 лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно з пунктом 8.2.

9.4. Провести попереднє розведення зразків та контролів відповідно до пункту 8.3.

9.5. В лунки стрипів ІФА-планшета внести по 90 µl **SAMPLE DILUENT**.

9.6. Внести в лунки по 10 µl попередньо розведених 1:10 контролів та досліджуваних зразків: в лунку A1 – **CONTROL +**, в лунки B1, C1 та D1 – **CONTROL -**, в решту лунок – досліджувані зразки. Таким чином, кінцеве розведення зразків та контролів в лунках ІФА-планшета має становити 1:100. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. Під час внесення зразків відбувається зміна кольору розчину з жовтого на зелений.

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.

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

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 µl розчином для промивання, залишити не менш як на 30 s;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 µl;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.9. В лунки стрипів внести по 100 µl **CONJUGATE SOLUTION**. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в п. 9.8.

9.11. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в лунки.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 15 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 µl **STOP SOLUTION**, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні **TMB SOLUTION**.

9.14. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620–695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання переконалися у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результатів аналізу можна проводити в одноквильовому режимі при довжині хвилі 450 nm, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише TMB SOLUTION та STOP SOLUTION).

10. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

10.1. Облік результатів аналізу

Розрахувати середнє значення ОГ негативного контролю (Nc), рівень граничного значення (Cut off - CO) та індекс позитивності зразка (IP_{sample}):

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

$$CO = Nc + 0,45;$$

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

де OD_{sample} – оптична густина зразка.

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

CONTROL +	ОГ ≥ 0,800
CONTROL -	ОГ ≤ 0,150
CONTROL -	Nc × 0,5 ≤ Ncn ≤ Nc × 2,0 де Ncn - кожне n-значення ОГ негативного контролю (Nc1, Nc2, Nc3)

Якщо одне зі значень ОГ негативного контролю виходить за межі вказаного вище інтервалу, його відкидають і розраховують Nc за рештою значень ОГ негативного контролю. Якщо більш ніж одне значення ОГ негативного контролю не відповідає зазначеним вимогам, то тест вважається некоректним і потребує повторного аналізу.

10.3. Інтерпретація результатів

IP _{sample} > 1,1	ПОЗИТИВНИЙ
0,8 ≤ IP _{sample} ≤ 1,1	НЕВИЗНАЧЕНИЙ*
IP _{sample} < 0,8	НЕГАТИВНИЙ

*Невизначені зразки рекомендується дослідити повторно. Якщо результати знову будуть у межах невизначених, слід провести відбір нового зразка.

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Для оцінки чутливості було проаналізовано 57 зразків сироваток крові, позитивних в іншій комерційній тест-системі, що має CE-маркування. Відносна чутливість Vitrotest® Bordetella pertussis IgM при цьому становила 98,2 %.

Для оцінки специфічності тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis IgM було проаналізовано 120 зразків сироваток крові, які не містили специфічних IgM за результатами досліджень в іншій комерційній тест-системі. Відносна специфічність при цьому склала 99,2 %.

11.2. Точність

Повторюваність результатів у межах однієї постановки аналізу (Intra assay repeatability)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох зразків з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на одній серії тест-системи.

N° зразку	IP _{сер}	CV, %
870	2,06	5,1
1360	5,08	7,7

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох зразків з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом чотирьох днів в чотирьох постановках аналізу по 8 повторів в кожному аналізі.

№ зразку	IP _{сеп}	CV, %
870	2,11	7,3
1360	5,04	5,3

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Позитивний результат, отриманий в тест-системі Vitrotest® Bordetella pertussis IgM, свідчить про наявність у пацієнта специфічних до *Bordetella pertussis* антитіл класу IgM.

Слід зауважити, що на початковій стадії інфікування результат ІФА може бути негативний через відсутність або низьку концентрацію антитіл до *Bordetella pertussis*. При наявності клінічних проявів захворювання рекомендується провести повторне тестування через два-чотири тижні, а також дослідити зразок пацієнта на специфічні антитіла класу IgG.

З обережністю слід інтерпретувати результати, отримані для імуносупресованих осіб та новонароджених.

Діагноз не може бути встановлений лише на підставі результатів серологічного тесту. Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів комплексу досліджень, анамнезу та клінічної картини.

13. ПРОБЛЕМИ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИНИКНУТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА, ТА СПОСОБИ ЇХ УСУНЕННЯ

<i>Можливі причини</i>	<i>Способи усунення проблем</i>
<i>Високий фон у лунках всього планшета</i>	
Забруднений промивач	Почистити головку промивача та промити 30 % розчином етилового спирту, потім дистильованою водою
Низька якість або забруднення води	Використовувати очищену воду з питомим опором ≥ 10 МΩ·см.
Використання погано помитого посуду	Використовувати хімічно чистий посуд
Використання дезінфікуючих засобів, що містять хлор	Не використовувати хлорвмісні дезінфікуючі засоби
Використання забруднених наконечників	Використовувати нові наконечники
Збільшено час інкубації або змінено температурний режим	Дотримуватися режиму інкубації відповідно до інструкції з використання
<i>Високий фон в окремих рядах</i>	
Повторне внесення розчину ТМБ	Розчин ТМБ вносити один раз
Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату	Прочистити піпетку і обережно набирати рідину
Забруднений один із каналів промивача	Почистити канал промивача, промити вошер
<i>Значення ОГ позитивного контролю нижче встановленої межі</i>	
Неправильно внесений або відсутній один із реагентів (кон'югат або розчин ТМБ)	Повторно провести ІФА, звернути увагу на правильність внесення цих реагентів
Скорочено час інкубації на одному з етапів	Проводити інкубацію відповідно до інструкції з використання
<i>Інтенсивність забарвлення лунок не відповідає отриманій оптичній густині</i>	
Зміщений оптичний промінь	Перевірити коректність роботи рідера

ЛІТЕРАТУРА

- Baughman A.L., Bisgard K.M., Edwards K.M. et al. Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. - 2004. - Vol.11, No.6. - P. 1045-1053.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and Protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Stockholm: ECDC; 2012.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory diagnosis and molecular surveillance of *Bordetella pertussis* - Stockholm: ECDC; 2022.
- Guiso N., Berbers G., Fry N.K. He Q., Riffelmann M., Wirsing von König C.H.; EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2011. - Vol.30, No.3. - P. 307-312.

5. Paradowska-Stankiewicz I., Rumik A., Bogusz J. et al. Duration of protection against Bordetella pertussis infection elicited by whole-cell and acellular vaccine priming in Polish children and adolescents // *Vaccine*. – 2021. – Vol.39, No.41. – P. 6067-6073.
6. Riffelmann M., Thiel K., Schmetz J. et al. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol.48, No.12. – P. 4459-4463.
7. World Health Organization. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by bordetella pertussis/bordetella parapertussis : update 2014.
8. Xing D., Wirsing von König C.H., Newland P. et al. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study // *Clinical and Vaccine Immunology*.- 2009. – Vol.16, No.3. – P. 303–311.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення $\leq n$ кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Берегти від прямих сонячних променів



Знак відповідності технічним регламентам



Не заморозувати

В інструкції використовуються позначення одиниць вимірювання у відповідності до Наказу Мінекономрозвитку України № 914 від 04.08.2015 р.

Назва величини	Одиниця		
	назва	позначення	
		міжн.	укр.
Час	година хвилина секунда	h min s	год хв с
Довжина	сантиметр міліметр нанометр	cm mm nm	см мм нм
Об'єм, місткість	літр мілілітр мікролітр	l ml μl	л мл мкл
Кількість речовини	моль мілімоль мікромоль	mol mmol μmol	моль млмоль мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Bordetella_pertussis-IgM_TK126_V01
Редакція Інструкції № 1 від 31.05.2024

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



ТОВ «Вітротест Біореагент»,
вул. М.Бойчука 18б, оф. 56, м. Київ, 01103, Україна (юридична адреса)
вул. Курортна, буд. 11, м. Київ, 04075, Україна (місцезнаходження виробництва)

тел.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest® Bordetella pertussis IgM

СХЕМА АНАЛІЗУ



Витримати всі реагенти та зразки мінімум 30 min при 18-25 °C перед використанням



В лунки **PREDILUTION PLATE** внести по 90 µl **SAMPE PREDILUENT** (коричнево-зелений колір) та по 10 µl контролів та зразків (колір змінюється з коричнево-зеленого на синій)



Внести в лунки **ELISA STRIPS** по 90 µl **SAMPLE DILUENT** (жовтий колір) та по 10 µl попередньо розведених контролів та зразків відповідно:
A1 – **CONTROL +**,
B1, C1, D1 – **CONTROL -**,
E1 та інші лунки – досліджувані зразки (колір змінюється з жовтого на зелений)



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 30 min при 37 °C



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 по 300 µl в лунку з 30 s замочуванням



Додати 100 µl **CONJUGATE SOLUTION** в кожну лунку (фіолетовий колір)



Накрити стрипи новою клейкою плівкою та інкубувати 30 min при 37 °C



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 по 300 µl в лунку з 30 s замочуванням



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



Інкубувати 15 min в темноті при 18-25 °C без клейкої плівки



Зупинити реакцію додаванням 100 µl **STOP SOLUTION** (колір змінюється з синього на жовтий)



Визначити оптичну густину (OD) при 450/620-695 nm

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

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

$$CO = Nc + 0,45;$$

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

Nc - середнє значення ОГ з **CONTROL -**,

CO - граничне значення, IP- індекс позитивності

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЗИТИВНИЙ
$0,8 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕВИЗНАЧЕНИЙ
$IP_{sample} < 0,8$	НЕГАТИВНИЙ

Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG

Імуноферментна тест-система для кількісного визначення антитіл класу IgG до токсину *Bordetella pertussis*

TK125
96 аналізів



1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментна тест-система Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG призначена для кількісного визначення антитіл класу IgG, специфічних до токсину *Bordetella pertussis*, у сироватці чи плазмі крові людини. Тест-набір може бути застосований як для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Кашлюк – небезпечна респіраторна інфекція, спричинена бактерією *Bordetella pertussis*. Характерними проявами захворювання є нападоподібний спастичний кашель, свистячий шум при вдиханні повітря, посткашльове блювання тощо. Найтяжче кашлюк протікає у немовлят і дітей раннього віку - нерідко з зупинкою дихання (апное) та смертельними випадками.

Кашлюк є всесвітньо поширеною хворобою з циклічним перебігом та піками захворюваності кожні 3-5 років. З огляду на тяжкість клінічних проявів в багатьох країнах світу впроваджені вакцинація проти кашлюку. Саме внаслідок широкомасштабної вакцинації, проведеної у 1950-1960 роках у розвинутих країнах, сталося різке зниження захворюваності (більш ніж на 90%) і смертності від кашлюку.

Однак, незважаючи на високий рівень охоплення населення щепленнями, кашлюк залишається проблемою охорони здоров'я в усьому світі: щорічно реєструється приблизно 140000 випадків захворювання.

В Україні відповідно до Національного календаря щеплень, вакцинувати дітей для профілактики кашлюку необхідно у віці 2, 4, 6 і 18 місяців. Для вакцинації дітей проти кашлюку на першому році життя можуть використовуватися вакцини як з ацелюлярним (АаКДП), так і з цільноклітинним (АКДП) кашлюковим компонентом. Сформований в результаті повного курсу вакцинації імунітет проти кашлюку зберігається впродовж 5-7 років.

Для діагностики кашлюку використовують лабораторні методи, серед яких найбільш поширеними є метод полімеразної ланцюгової реакції (виявлення збудника протягом перших 2-3 тижнів хвороби) та імуноферментний аналіз (визначення специфічних антитіл). Виявлення антитіл класу IgM, специфічних до *Bordetella pertussis*, свідчить про гостру інфекцію кашлюку або нещодавно перенесену вакцинацію. Визначення антитіл класу IgG до специфічного для *Bordetella pertussis* токсину (PT) у сироватці крові невакцинованої особи дозволяє діагностувати минулу або поточну інфекцію кашлюку, а також надає інформацію про специфічний імунітет після вакцинації.

Стандартизація кількісного визначення антитіл класу IgG до токсину *Bordetella pertussis* в сироватці чи плазмі крові людини забезпечується використанням для виготовлення внутрішніх калібраторів ІФА-наборів Міжнародного стандарту ВООЗ з встановленою концентрацією специфічних до PT IgG в міжнародних одиницях IU/ml.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Визначення антитіл класу IgG, специфічних до токсину *Bordetella pertussis*, в тест-системі Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА. У лунках планшету засорбований очищений токсин *Bordetella pertussis*. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування, за наявності у зразках, специфічних до токсину *Bordetella pertussis* антитіл з антигенами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат антивидових анти-IgG моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, які зв'язуються з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Комплекси антиген-ан-

титло виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 15 min інкубації реакція зупиняється і оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm. Інтенсивність жовтого забарвлення прямо пропорційна кількості антитіл у зразку.

Внутрішні калібратори тест-системи Vitrotest® *Bordetella pertussis* Toxin IgG стандартизовані за 1-м Міжнародним стандартом WHO International Standard Pertussis Antiserum (Human) 1st IS NIBSC code: 06/140 (NIBSC, Велика Британія).

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ІФА-планшет У кожній лунці планшету засорбований очищений токсин <i>Bordetella pertussis</i> . Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунок.
PREDILUTION PLATE	1x96 лунок	Планшет для попереднього розведення зразків
CAL 0	1x0,3 ml	Калібратор 0 Розчин альбуміну з консервантом (жовтий).
CAL 40	1x0,3 ml	Калібратор 40 Розчин специфічних IgG до токсину <i>Bordetella pertussis</i> у концентрації 40 IU/ml зі стабілізаторами та консервантом (зелений).
CAL 100	1x0,3 ml	Калібратор 100 Розчин специфічних IgG до токсину <i>Bordetella pertussis</i> у концентрації 100 IU/ml зі стабілізаторами та консервантом (помаранчевий).
CAL 200	1x0,3 ml	Калібратор 200 Розчин специфічних IgG до токсину <i>Bordetella pertussis</i> у концентрації 200 IU/ml зі стабілізаторами та консервантом (фіолетовий).
CONTROL +	1x0,3 ml	Позитивний контроль Розчин з відомим вмістом* специфічних IgG до токсину <i>Bordetella pertussis</i> зі стабілізаторами та консервантом (червоний).
SAMPLE PREDILUENT	1x20 ml	Розчин для попереднього розведення зразків Буферний розчин з детергентом та консервантом (коричнево-зелений).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Розчин для розведення зразків Буферний розчин з детергентом та консервантом (жовтий).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Розчин кон'югату Буферний розчин моноклональних антитіл до IgG людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, зі стабілізаторами та консервантом (фіолетовий), готовий до використання.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.

WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Розчин для промивання Tw20 (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

Клейка плівка (2), бланк внесення проб (1), бланк для калібрувального графіку (1), інструкція з використання та сертифікат якості.

*- діапазон концентрації IgG в IU/ml вказаний на етикетці мікропробірки з позитивним контролем та в сертифікаті якості.

4.2. Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- автоматичні піпетки змінного об'єму на 10–1000 µl та наконечники до них;
- спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 nm;
- мірний лабораторний посуд (10-1000 ml);
- деіонізована або дистильована вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- контейнери для відходів потенційно зараженого матеріалу;
- таймер;
- фільтрувальний папір;
- одноразові рукавички;
- дезінфікуючі засоби;
- захисний одяг.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

5.1. Застереження

Дотримання часу інкубації та температури є надзвичайно важливим для коректного результату ІФА.

- не використовувати компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовувати під час аналізу та не змішувати компоненти різних серій, компоненти з тест-систем різних нозологій або реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

Примітка: допускається використання WASH TWEEN 20X, TMB SOLUTION, SAMPLE PREDILUENT, STOP SOLUTION *інших серій.*

- після використання реагенту закривати кожен флакон своєю кришкою;
- під час промивання контролювати наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовувати новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникати потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;
- TMB SOLUTION має бути безбарвним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникати контакту TMB SOLUTION з металами або іонами металів. Для роботи використовувати лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- ні в якому разі не використовувати один і той же посуд для CONJUGATE SOLUTION та TMB SOLUTION.

Виробник не несе відповідальність за будь-які некоректні результати та несприятливі випадки, що виникли внаслідок порушень вищенаведених застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання спектрофотометра).

5.2. Заходи безпеки

- всі реагенти набору призначені тільки для *in vitro* діагностики та можуть використовуватися тільки кваліфікованим персоналом;
- постановку аналізу проводити лише в захисному одязі, одноразових рукавичках та захисних окулярах;
- не допускається приймати їжу, пити, палити або користуватися косметикою у кімнаті виконання тесту;

- не піпетувати розчини ротом;
- калібратори та позитивний контроль тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG протестовані та визнані негативними на HBsAg та антитіла до ВІЛ, ВГС та *Treponema pallidum*, однак працювати з калібраторами, досліджуваними зразками та позитивним контролем слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потраплянні [TMB SOLUTION] [STOP SOLUTION] та [CONJUGATE SOLUTION] на слизові оболонки та шкіру необхідно негайно промити уражене місце великою кількістю води;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню дезінфікуючим засобом, а потім витерти насухо фільтрувальним папером. В іншому випадку кислоту спочатку потрібно нейтралізувати розчином бікарбонату натрію, а потім витерти поверхню як описано вище.

5.3. Утилізація відходів

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 h за кімнатної температури, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5 % протягом 30 min, або іншими дозволеними дезінфікуючими засобами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування за температури 121 °C упродовж 1 h;
- не автоклаувати розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- видалення інактивованих відходів проводити згідно з чинним законодавством України;
- видалення решти компонентів тест-систем після використання проводити згідно GLP (good laboratory practice) та чинного законодавства України в сфері поводження з відходами.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати за температури 2-8 °C. Не допускається заморожування тест-системи. Транспортувати набір за температури 2-8 °C. Допускається одноразове транспортування за температури не вище 23 °C протягом двох днів.

Після першого відкриття первинного пакування компоненти тест-системи є стабільними протягом 3 місяців, окрім тих, що зазначені в п. 8 даної Інструкції.

7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразки сироватки чи плазми (EDTA, літій-гепарин, цитрат натрію, фторид калію) крові зберігати за температури 2-8 °C не більше 3 днів після забору. Для більш тривалого зберігання зразки тримати у морозильній камері за температури від -20 до -70 °C. Заморожені зразки перед використанням слід розморозити та витримати за кімнатної температури упродовж 30 min. Не використовувати прогріті зразки. Після розморозування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникати повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільніть зразок від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 обертів/min протягом 10-15 min. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактеріальним проростом. На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобіну в концентрації до 10 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи за кімнатної температури 18-25 °C протягом 30 min перед використанням!

8.1. Підготовка ІФА-планшета

[ELISA STRIPS] упаковано під вакуумом з вологопоглиначем.

Для попередження конденсації води в лунках слід відкривати [ELISA STRIPS] лише після витримання 30 min за кімнатної температури. Потім розкрити вакуумну упаковку, відокремити необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакувати з вологопоглиначем та *зберігати щільно закритими на замок (zip-lock)* за температури 2-8 °C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Приготування розчину для промивання

Для приготування розчину для промивання необхідно розвести концентрат **WASH TWEEN 20X** 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішати. Наприклад, 4 ml концентрату + 76 ml води, що достатньо для 8 лунок. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину для промивання потрібно прогріти флакон за температури 37 °C до повного розчинення кристалів (15 - 20 min). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8 °C не більше 7 днів.

8.3. Попереднє розведення зразків, калібраторів та позитивного контролю

Досліджувані зразки, калібратори та позитивний контроль попередньо розвести у 10 разів **SAMPLE PREDILUENT**. Для цього в необхідну кількість лунок **PREDILUTION PLATE** (комплектуються в наборі) внести по 90 µl **SAMPLE PREDILUENT** та додати по 10 µl зразків, калібраторів та позитивного контролю. Під час внесення зразків, калібраторів та позитивного контролю обережно піпетувати суміш, при цьому колір розчину для попереднього розведення зразків повинен змінитись з коричнево-зеленого на синій.

Після розведення та перенесення зразків використані лунки **PREDILUTION PLATE** необхідно знезаразити шляхом замочування в дезінфікуючому розчині або автоклавуванням.

Процедуру розведення зразків, калібраторів та позитивного контролю необхідно проводити безпосередньо перед аналізом.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок **ELISA STRIPS** для аналізу (кількість досліджуваних зразків, 1 лунку для позитивного контролю та 4 лунки для калібраторів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з калібраторам та позитивним контролем обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно з пунктом 8.2.

9.4. Провести попереднє розведення зразків, калібраторів та позитивного контролю відповідно до пункту 8.3.

9.5. В лунки стрипів ІФА-планшета внести по 90 µl **SAMPLE DILUENT**.

9.6. Внести в лунки по 10 µl попередньо розведених 1:10 калібраторів, позитивного контролю та досліджуваних зразків в наступному порядку: в лунку A1 - **CAL 200**, B1 - **CAL 100**, C1 - **CAL 40**, D1 - **CAL 0** та E1 - **CONTROL +**, в решту лунок – досліджувані зразки. Таким чином, кінцеве розведення зразків, калібраторів та позитивного контролю в лунках ІФА-планшета має становити 1:100. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. Під час внесення зразків відбувається зміна кольору розчину з жовтого на зелений.

*З огляду на технічні особливості обладнання, що використовується для аналізу, порядок внесення калібраторів може бути зворотнім: в лунку A1 - **CAL 0**, B1 - **CAL 40**, C1 - **CAL 100**, D1 - **CAL 200**.*

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.

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

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 µl розчином для промивання, залишити не менш як на 30 s;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 µl;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.9. В лунки стрипів внести по 100 µl **CONJUGATE SOLUTION**. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в п. 9.8.

9.11. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в лунки.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 15 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 µl **STOP SOLUTION**, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні **TMB SOLUTION**.

9.14. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання переконайтеся у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 nm, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише TMB SOLUTION) та STOP SOLUTION).

10. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

10.1. Достовірність результатів аналізу

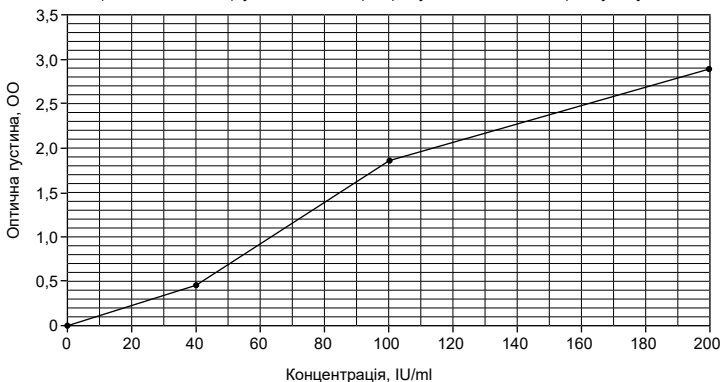
Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

CAL 0	$OG \leq 0,100$
CAL 40	$OG \geq 0,200$
CAL 100	$OG \geq 0,800$
CAL 200	$OG \geq 1,400$
CONTROL +	В межах діапазону концентрації, вказаної на етикетці мікропробірки з позитивним контролем та в сертифікаті якості

10.2. Облік результатів аналізу

Для визначення концентрації антитіл класу IgG в IU/ml побудувати калібрувальний графік: на осі OY відкладіть значення ОГ чотирьох калібраторів CAL 0, CAL 40, CAL 100, CAL 200, а на осі OX – відповідні їм концентрації - 0, 40, 100, 200 IU/ml, відповідно. За допомогою калібрувального графіку визначте концентрацію (IU/ml) специфічних IgG у досліджуваних зразках та CONTROL +, яка відповідає значенню отриманої ОГ.

Приклад калібрувального графіку наведено на рисунку:



Примітка: Не використовуйте цей графік для визначення концентрації специфічних антитіл у Вашому аналізі.

У разі, якщо оптична густина досліджуваних зразків вище значення ОГ CAL 200, результат може бути виданий «>200 IU/ml». Для отримання точної концентрації такі зразки мають бути повторно досліджені з додатковим попереднім розведенням 1:4, а отриману концентрацію помножити на ступінь розведення 4.

Приклад додаткового розведення зразків 1:4:

У PREDILUTION PLATE або в чисту нову пробірку внести 60 μ l SAMPLE PREDILUENT та 20 μ l зразку, ретельно перемішати (отримуємо додаткове розведення 1:4).

Далі провести розведення зразків та всю процедуру ІФА згідно п. 8.3 та п. 9 даної Інструкції, використовуючи для дослідження не цільний, а вже додатково розведений 1:4 зразок.

В цьому випадку визначену за графіком концентрацію специфічних антитіл слід перемножити на ступінь розведення 4:

$$\text{кінцева концентрація} = \text{концентрація за графіком} \times 4$$

Якщо при повторному дослідженні в додатковому розведенні 1:4 оптична густина досліджуваних зразків все одно вище значення ОГ [CAL 200] рекомендовано такі зразки повторно дослідити у додатковому розведенні 1:10. В цьому випадку визначену за графіком концентрацію специфічних антитіл слід перемножити на ступінь розведення 10.

Приклад додаткового розведення зразків 1:10:

У [PREDILUTION PLATE] або в чисту нову пробірку внести 90 μl [SAMPLE PREDILUENT] та 10 μl зразку, ретельно перемішати (отримуємо додаткове розведення 1:10).

Далі провести розведення зразків та всю процедуру ІФА згідно п. 8.3 та п. 9 даної Інструкції, використовуючи для дослідження не цільний, а вже додатково розведений 1:10 зразок.

В цьому випадку визначену за графіком концентрацію специфічних антитіл слід перемножити на ступінь розведення 10:

$$\text{кінцева концентрація} = \text{концентрація за графіком} \times 10$$

Для зручності обліку результатів реакції можна використовувати комп'ютерні програми читування та обрахунку результатів досліджень.

10.3. Інтерпретація результатів

Концентрація IgG	Інтерпретація
> 100 IU/ml	ПОЗИТИВНИЙ
40-100 IU/ml	НЕВИЗНАЧЕНИЙ*
< 40 IU/ml	НЕГАТИВНИЙ

* Невизначені зразки рекомендується дослідити повторно. Якщо результати знову будуть в межах невизначених, слід провести відбір нового зразка через 7-10 днів та дослідити повторно паралельно з попереднім зразком.

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

В порівняльних дослідженнях тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG з аналогічною імуоферментною тест-системою, що має SE-маркування, з використанням 81 зразку сироваток крові з вмістом антитіл класу IgG до токсину *Bordetella pertussis* в межах 0 – 420 IU/ml коефіцієнт кореляції (R) отриманих результатів становив 0,982, коефіцієнт детермінації (R²) – 0,964.

11.2. Точність

Повторюваність результатів у межах однієї постановки аналізу (Intra assay repeatability)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на одній серії тест-системи.

№ зразка	Концентрація, IU/ml	CV, %
3s	111,2	4,9
1254	43,6	3,7

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом чотирьох днів в чотирьох постановках аналізу по 8 повторів в кожному аналізі.

№ зразка	Концентрація, IU/ml	CV, %
3s	125,0	7,4
1254	47,7	5,2

11.3. Аналітична чутливість

«Межа виявлення» (LoD) – найменша концентрація аналізованої речовини в зразку, що виявляється із заявленою ймовірністю для тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG становить 3,22 IU/ml.

11.4. Діапазон лінійності

Діапазон лінійності тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG знаходиться в межах 3,5-181 IU/ml.

11.5. Відповідність калібраторів тест-системи Міжнародному Стандарту

Калібратори тест-системи Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG відповідають 1-му Міжнародному стандарту WHO International Standard Pertussis Antiserum (Human) 1st IS NIBSC code: 06/140 (NIBSC, Велика Британія). Коефіцієнт детермінації (R^2) становить 0,992.

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Позитивний результат в тест-системі Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgG, специфічних до токсину *Bordetella pertussis*, які продукуються організмом при інфікуванні бактерією або після вакцинації. Наявність антитіл цього класу у новонароджених не є доказом інфікування *B. pertussis*.

Встановлений рівень антитіл класу IgG до токсину *Bordetella pertussis* > 100 IU/ml може свідчити про нещодавній контакт з антигеном (наприклад, при гострій інфекції або вакцинації).

Для коректної діагностики активного інфекційного процесу рекомендується провести дослідження на наявність IgG антитіл у парних зразках, отриманих з інтервалом забору крові в 2-4 тижні, а також провести тестування на наявність специфічних антитіл класу IgM, наприклад, у тест-системі Vitrotest® Bordetella pertussis IgM.

Якщо зразок отримано через невеликий проміжок часу після інфікування, то антитіла класу IgG можуть не виявлятися.

Остаточний діагноз не може бути встановлений лише на підставі результатів серологічного тесту. При встановленні діагнозу слід враховувати результати комплексу лабораторних та інструментальних досліджень, а також клінічні прояви захворювання.

13. ПРОБЛЕМИ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИНИКНУТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА, ТА СПОСОБИ ЇХ УСУНЕННЯ

<i>Можливі причини</i>	<i>Способи усунення проблем</i>
<i>Високий фон у лунках всього планшета</i>	
Забруднений промивач	Почистити головку промивача та промити 30 % розчином етилового спирту, потім дистильованою водою
Низька якість або забруднення води	Використовувати очищену воду з питомим опором ≥ 10 МΩ·см.
Використання погано помитого посуду	Використовувати хімічно чистий посуд
Використання дезінфікуючих засобів, що містять хлор	Не використовувати хлорвмісні дезінфікуючі засоби
Використання забруднених наконечників	Використовувати нові наконечники
Збільшено час інкубації або змінено температурний режим	Дотримуватися режиму інкубації відповідно до інструкції з використання
<i>Високий фон в окремих рядах</i>	
Повторне внесення розчину ТМБ	Розчин ТМБ вносити один раз
Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату	Прочистити піпетку і обережно набирати рідину
Забруднений один із каналів промивача	Почистити канал промивача, промити вошер

Значення ОГ позитивного контролю та калібраторів нижче встановленої межі

Неправильно внесений або відсутній один із реагентів (кон'югат або розчин ТМБ)	Повторно провести ІФА, звернути увагу на правильність внесення цих реагентів
Скорочено час інкубації на одному з етапів	Проводити інкубацію відповідно до інструкції з використання

Інтенсивність забарвлення лунок не відповідає отриманій оптичній густині

Зміщений оптичний промінь	Перевірити коректність роботи рідера
---------------------------	--------------------------------------

ЛІТЕРАТУРА

1. Baughman A.L., Bisgard K.M., Edwards K.M. et al. Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. - 2004. – Vol.11, No.6. -P. 1045-1053.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and Protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Stockholm: ECDC; 2012.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory diagnosis and molecular surveillance of *Bordetella pertussis* - Stockholm: ECDC; 2022.
4. Guiso N., Berbers G., Fry N.K. He Q., Riffelmann M., Wirsing von König C.H.; EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2011. – Vol.30, No.3. - P. 307-312.
5. Paradowska-Stankiewicz I., Rumik A., Bogusz J. et al. Duration of protection against *Bordetella pertussis* infection elicited by whole-cell and acellular vaccine priming in Polish children and adolescents // *Vaccine*. – 2021. – Vol.39, No.41. - P. 6067-6073.
6. Riffelmann M., Thiel K., Schmetz J. et al. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis* // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol.48, No.12. – P. 4459-4463.
7. World Health Organization. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *bordetella pertussis/bordetella parapertussis* : update 2014.
8. Xing D., Wirsing von König C.H., Newland P. et al. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study // *Clinical and Vaccine Immunology*.- 2009. – Vol.16, No.3. – P. 303–311.

В інструкції використовуються позначення одиниць вимірювання у відповідності до Наказу Мінекономрозвитку України № 914 від 04.08.2015 р.

Назва величини	Одиниця		
	назва	позначення	
		міжн.	укр.
Час	година хвилина секунда	h min s	год хв с
Довжина	сантиметр міліметр нанометр	cm mm nm	см мм нм
Об'єм, місткість	літр мілілітр мікролітр	l ml μl	л мл мкл
Кількість речовини	моль мілімоль мікромоль	mol mmol μmol	моль млмоль мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF

Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування

IVD

Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення $\lt; n >$ кількості досліджень



Обмеження температури

LOT

Код партії



Використати до



Берегти від прямих сонячних променів



Знак відповідності технічним регламентам

**DO NOT
FREEZE**

Не заморожувати

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Bordetella_pertussis_Toxin_IgG_TK125_V01
Редакція Інструкції № 01 від 31.05.2024

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



ТОВ «Вітротест Біореагент»,
вул. М.Бойчука 186, оф. 56, м. Київ, 01103, Україна (юридична адреса)
вул. Курортна, буд. 11, м. Київ, 04075, Україна (місцезнаходження
виробництва)

тел.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest® Bordetella pertussis Toxin IgG

СХЕМА АНАЛІЗУ



Витримати всі реагенти та зразки мінімум 30 min при 18-25 °C перед використанням



В лунки **PREDILUTION PLATE** внести по 90 µl **SAMPE PREDILUENT** (коричнево-зелений колір) та по 10 µl калібраторів, позитивного контролю та зразків (колір змінюється з коричнево-зеленого на синій)



Внести в лунки **ELISA STRIPS** по 90 µl **SAMPLE DILUENT** (жовтий колір) та по 10 µl попередньо розведених калібраторів, позитивного контролю та зразків відповідно:

в лунки A1, B1, C1, D1 та E1 – 10 µl розведених 1:10 калібраторів **CAL 200**, **CAL 100**, **CAL 40**, **CAL 0** та **CONTROL +**, відповідно.

В решту лунок – по 10 µl розведених 1:10 досліджуваних зразків. (колір змінюється з жовтого на зелений)



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 30 min при 37 °C



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 по 300 µl в лунку з 30 s замочуванням



Додати 100 µl **CONJUGATE SOLUTION** в кожену лунку (фіолетовий колір)



Накрити стрипи новою клейкою плівкою та інкубувати 30 min при 37 °C



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 по 300 µl в лунку з 30 s замочуванням



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



Інкубувати 15 min в темноті при 18-25 °C без клейкої плівки



Зупинити реакцію додаванням 100 µl **STOP SOLUTION** (колір змінюється з синього на жовтий)



Визначити оптичну густину (OD) при 450/620-695 nm

Побудувати калібрувальну криву, визначити концентрацію специфічних до токсину *Bordetella pertussis* антитіл класу IgG (IU/ml) в досліджуваних зразках. Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Концентрація IgG	Інтерпретація
> 100 IU/ml	ПОЗИТИВНИЙ
40-100 IU/ml	НЕВИЗНАЧЕНИЙ*
< 40 IU/ml	НЕГАТИВНИЙ