

№ 06/22

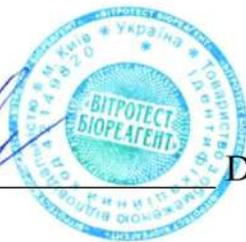
Date: 19.01.2022 p.

STATEMENT

We, Vitrotest Bioreagent LLC, having a registered office at M. 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»

DECLARATION OF CONFORMITY №UA-TK051

Manufacturer: Vitrotest Bioreagent LLC
State registration № 42149820

Legal address: M.Boychuka 18b, of.56, Kyiv 01103 Ukraine
Manufacturer's address: Kurortnaya 11, Kyiv, 04075, Ukraine

Description of the product:

Name	Catalog Number
ELISA test-kit for the determination of antibodies to <i>Ascaris lumbricoides</i> «Vitrotest Anti-Ascaris»	TK051

Classification:
According to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Is not a part of A and B lists, is not a device for self-testing, not for performance assessment.

Conformity assessment procedure: Annex 3 of medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Vitrotest Bioreagent declares the execution of all demands regarding the device, that was mentioned above, according to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754, and the requirements of further regulations:

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

The declaration is made under sole responsibility of the manufacturer.

Date of issue: 31.10.2019
Validity of declaration till: 31.10.2024

Director



Ihor Nikolaienko, Ph.D.

DECLARATION OF CONFORMITY №UA-TK039

Manufacturer: Vitrotest Bioreagent LLC
State registration № 42149820

Legal address: M.Boychuka 18b, of.56, Kyiv 01103 Ukraine

Manufacturer's address: Kurortnaya 11, Kyiv, 04075, Ukraine

Description of the product:

Name	Catalog Number
ELISA test-kit for the qualitative and semiquantitative determination of IgG antibodies to SARS-CoV-2 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG»	TK039

Classification:

According to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Is not a part of A and B lists, is not a device for self-testing, not for performance assessment.

Conformity assessment procedure:

Annex 3 of medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Vitrotest Bioreagent declares the execution of all demands regarding the device, that was mentioned above, according to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754, and the requirements of further regulations:

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

The declaration is made under sole responsibility of the manufacturer.

Date of issue: 17.04.2020

Validity of declaration till: 17.04.2025

Director


(signature)

Ihor Nikolaienko, Ph.D.
(ПІП)

Edition 1 from 17.04.2020



DECLARATION OF CONFORMITY №UA-TK033

Manufacturer: Vitrotest Bioreagent LLC
State registration № 42149820

Legal address: M.Boychuka 18b, of.56, Kyiv 01103 Ukraine
Manufacturer's address: Kurortnaya 11, Kyiv, 04075, Ukraine

Description of the product:

Name	Catalog Number
ELISA test-kit for the qualitative and semiquantitative determination of IgA antibodies to SARS-CoV-2 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgA»	TK033
ELISA test-kit for the qualitative determination of IgM antibodies to SARS-CoV-2 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM»	TK034, TK042

Classification:

According to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Is not a part of A and B lists, is not a device for self-testing, not for performance assessment.

Conformity assessment procedure:

Annex 3 of medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Vitrotest Bioreagent declares the execution of all demands regarding the device, that was mentioned above, according to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754, and the requirements of further regulations:

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

The declaration is made under sole responsibility of the manufacturer.

Date of issue: 20.11.2020

Validity of declaration till: 20.11.2025

Director



Ihor Nikolaienko, Ph.D.
(п.п.п.)

DECLARATION OF CONFORMITY №UA-TK040

Manufacturer: Vitrotest Bioreagent LLC
State registration № 42149820

Legal address: M.Boychuka 18b, of.56, Kyiv 01103 Ukraine
Manufacturer's address: Kurortnaya 11, Kyiv, 04075, Ukraine

Description of the product:

Name	Catalog Number
ELISA test-kit for quantitative determination of IgG antibodies to SARS-CoV-2 spike protein «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike»	TK040

Classification:

According to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Is not a part of A and B lists, is not a device for self-testing, not for performance assessment.

Conformity assessment procedure:

Annex 3 of medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754

Vitrotest Bioreagent declares the execution of all demands regarding the device, that was mentioned above, according to medical devices technical regulation for *in vitro* diagnostics, approved by Cabinet of Ministers decree from 02.10.2013 №754, and the requirements of further regulations:

ДСТУ EN ISO 13485:2018

ДСТУ EN ISO 14971:2015

ДСТУ EN 13641:2015

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

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

ДСТУ EN 13612:2015

ДСТУ EN ISO 18113-1:2018 (EN ISO 18113-1:2011, IDT; ISO 18113-1:2009, IDT)

ДСТУ EN ISO 18113-2:2018 (EN ISO 18113-2:2011, IDT; ISO 18113-2:2009, IDT)

ДСТУ EN 980:2007

The declaration is made under sole responsibility of the manufacturer.

Date of issue: 15.03.2021

Validity of declaration till: 15.03.2026

Director



(signature)

Ihor Nikolaienko, Ph.D.
(ПІП)

Edition 1 from 15.03.2021



**СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА (ПАСПОРТ)
на иммуноферментную тест-систему
«Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike™»
для количественного определения антител класса IgG к
Spike-белку коронавируса SARS-CoV-2**

Серия: 0321

Дата изготовления: 2021-04-02

Срок годности: 2022-04-02

Каталожный номер и вариант комплектации: ТК040 96-1Т

Комплектность тест-системы и срок годности компонентов

Компонент	Серия	Срок годности
ИФА-планшет	0321	2022/12/31
Калибратор 0	0321	2023/01/01
Калибратор 25	0321	2023/01/01
Калибратор 50	0321	2023/01/01
Калибратор 100	0321	2023/01/01
Калибратор 200	0321	2023/01/01
Положительный контроль	0321	2023/01/01
Раствор для промывания Tw20 (20x) (концентрат)	0221	2023/03/04
Раствор для предварительного разведения сывороток	0221	2023/03/23
Раствор для разведения сывороток	0321	2022/12/30
Раствор конъюгата	0321	2022/12/30
Раствор ТМБ	0321	2023/03/02
Стоп-реагент	0121	2023/01/19
Планшет для предварительного разведения образцов	x	Неограниченный
Клейкая пленка	x	Неограниченный
Бланк внесения проб	x	Неограниченный
Бланк калибровочного графика	x	Неограниченный
Инструкция	Редакция 2	Неограниченный

Диагностические характеристики тест-системы

Показатель	Результат контроля	Требования нормативной документации
ОП Калибратор 0 (450/620 нм)	0,019 ОЕ	≤ 0,100 ОО
ОП Калибратор 25 (450/620 нм)	0,353 ОЕ	≥ 0,120 ОО
ОП Калибратор 50 (450/620 нм)	1,066 ОЕ	-
ОП Калибратор 100 (450/620 нм)	2,095 ОЕ	-
ОП Калибратор 200 (450/620 нм)	3,334 ОЕ	≥ 1,500 ОО
Положительный контроль (450/620 нм)	89,4 ВАУ/ml	51-119 ВАУ/ml
Чувствительность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %
Специфичность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %

Вывод:

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike™» для количественного определения антител класса IgG к Spike-белку коронавируса SARS-CoV-2 серии 0321 соответствует требованиям ТУ У 24.4-36555928-001:2011 и инструкции по применению.

Дата: 2021/04/06

Документ сгенерирован в электронном виде.

Действителен без подписи.

СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА (ПАСПОРТ)
на иммуноферментную тест-систему «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM»
для качественного определения антител класса IgM к коронавирусу
SARS-CoV-2

Серия: 3220

Дата изготовления: 2020-11-05

Срок годности: 2021-05-05

Каталожный номер и вариант комплектации: ТК034 96-1Т

Комплектность тест-системы и срок годности компонентов

Компонент	Серия	Срок годности
ИФА - планшет	2920	2022/08/03
Положительный контроль	3120	2021/08/03
Отрицательный контроль	2820	2021/08/03
Раствор для промывания Tw20 (20x) (концентрат)	1120	2022/10/12
Раствор для разведения сывороток	1920	2022/07/20
Раствор конъюгата	3220	2021/06/03
Раствор ТМБ	1220 1320	2022/10/12 2022/11/02
Стоп - реагент	0920	2022/10/15
Клейкая пленка	x	Неограниченный
Бланк внесения проб	x	Неограниченный
Инструкция	Редакция 5	Неограниченный

Диагностические характеристики тест-системы

Показатель	Результат контроля	Требования нормативной документации
ОП положительного контроля (450/620 нм)	3,013 00	≥ 1,200 00
ОП отрицательного контроля (450/620 нм)	0,021 00	≤ 0,150 00
Чувствительность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %
Специфичность на внутрипроизводственной панели сывороток	100 %	100 %

Вывод:

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» для качественного определения антител класса IgM к коронавирусу SARS-CoV-2 серии 3220 соответствует требованиям ТУ У 24.4-36555928-001:2011 и инструкции по применению.

Дата: 2020/11/09

Документ сгенерирован в электронном виде.

Действителен без подписи.

СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ на імуноферментну тест-систему для виявлення антитіл до *Ascaris lumbricoides* «Vitrotest Anti-Ascaris»

Серія:	0419	Дата виготовлення:	2019-12-06
Номер за каталогом та варіант комплектації:	TK051 96-1T	Строк придатності:	2020-12-06

Комплектність тест-системи та строк придатності компонентів

Компонент	Колір, кількість та об'єм (або інші характеристики)	Серія	Строк придатності
ІФА-планшет	1 шт.(12 стрипів по 8 лунок), цілісність вакуумної упаковки збережено	0419	2021/02/28
Позитивний контроль	Рожева рідина, мікропробірка з червоно-помаранчевою кришкою, 1×0,3 мл	0419	2021/02/28
Негативний контроль	Жовта рідина, мікропробірка з зеленою кришкою, 1×0,5 мл	0319	2021/03/02
Розчин для промивання Tween20 (20x) (концентрат)	Безбарвна рідина, білий флакон з білою кришкою, 1×50,0 мл	0519	2021/05/21
Розчин для розведення сироваток	Коричнево-зелена рідина, білий флакон з синьою кришкою, 1×12,0 мл	0419	2021/02/22
Розчин кон'югату	Зелена рідина, білий флакон з зеленою кришкою, 1×12,0 мл	0419	2021/02/22
Розчин ТМБ	Безбарвна рідина, чорний флакон з чорною кришкою, 1×12,0 мл	0319	2021/04/18
Стоп-реагент	Безбарвна рідина, білий флакон з червоною кришкою, 1×12,0 мл	0519	2021/05/21
Клейка плівка	У наявності 2 шт.	x	Необмежений
Бланк внесення проб	У наявності 1 екземпляр	x	Необмежений
Інструкція	1 екземпляр (редакція 1)	x	Необмежений

Діагностичні характеристики тест-системи

Показник	Результат контролю	Вимоги нормативної документації
ОГ позитивного контролю (450/620 нм)	2,763 00	≥ 1,2 00
ОГ негативного контролю (450/620 нм)	0,017 00	≤ 0,15 00
Чутливість на внутрішньовиробничій панелі сироваток	100 %	100 %
Специфічність на внутрішньовиробничій панелі сироваток	100 %	100 %

Висновок: імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до *Ascaris lumbricoides* «Vitrotest Anti-Ascaris» серії 0419 відповідає вимогам ТУ.У 24.4–36555928–001:2011.

Директор ТОВ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

М.М. Ніколаєнко І.В.



1. INTENDED USE

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

2. CLINICAL VALUE

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

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

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

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

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

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

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

4.2. Material required but not provided

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

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

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

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

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

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

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

5.2. Safety

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

6. STORAGE AND STABILITY

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

7. SPECIMEN COLLECTION

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

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. [ELISA STRIPS] preparation

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

8.2. Washing solution preparation

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

9. ASSAY PROCEDURE

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

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

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

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

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

10.2. Validation of the test

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

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

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

10.3. Interpretation of results

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

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

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

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

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

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

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

Inter assay reproducibility

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

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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

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

13. TROUBLESHOOTING

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

13. REFERENCE

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

SYMBOLS

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

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

Edition 1st, 12.09.2019.

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



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



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



ASSAY PROCEDURE



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



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



Dispense 10µl of controls and samples into the wells:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 and other wells – patient samples
(colour changes from brown-green to blue)



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



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



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



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



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



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



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



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



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

CALCULATION

$$N_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3})/3;$$

$$CO = N_c + 0.3;$$

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

$$N_c - OD_{\text{mean}} \text{ for 3 [CONTROL -]}$$

CO - Cut off, IP- Index of Positivity

INTERPRETATION

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» предназначена для количественного определения IgG антител к spike-белку коронавируса SARS-CoV-2, который синтезируется в организме человека в результате перенесенного заболевания или вакцинации, в образцах сыворотки и плазмы (ЭДТА, литий-гепарин) крови человека методом иммуноферментного анализа.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Коронавирусная инфекция COVID-19 – это инфекционное заболевание, вызываемое новым коронавирусом SARS-CoV-2, который раньше у людей не обнаруживался.

Влияние этого вируса приводит к развитию респираторного гриппоподобного заболевания с такими симптомами как кашель, лихорадка, в более тяжелых случаях развивается пневмония. Средний инкубационный период при COVID-19 составляет 6,5 суток, а его крайние сроки – от 3 до 21 суток.

Коронавирус SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом с характерной оболочкой с отростками в виде «короны». К основным структурным белкам вируса принадлежат белок оболочки (Е), белок мембраны (М), спайковый (S) гликопротеин и нуклеокапсидный (N) белок.

Белок S на поверхности вириона SARS-CoV-2 опосредует распознавание рецепторов и слияние мембран с молекулами ACE2, которые обычно экспрессируются на пневмоцитах II типа, эпителиальных клетках толстого кишечника и почек. Он содержит три фрагмента, а именно, эктодомен, трансмембранный домен и короткий внутриклеточный сегмент. Эктодомен состоит из рецептор-связывающей субъединицы S1, содержащей RBD-домен, и субъединицы слияния с оболочкой (S2). Во время вирусной инфекции С-концевой домен фрагмента S1 связывается с внеклеточным доменом пептидазы (PD) ACE2 для обеспечения прикрепления вируса к поверхности клетки-мишени. N-концевой домен фрагмента S1 связывается с гликанами. Присоединение вызывает расщепление белка S между фрагментами S1 и S2 клеточными протеазами, что, в свою очередь, инициирует слияние вирусных и клеточных оболочек с помощью субъединицы S2.

Хотя большинство вирусных белков способны индуцировать продукцию специфических антител после заражения SARS-CoV-2, а определение антител к N- и S-белку широко используется в серологической диагностике COVID-19, антитела, направленные на вирусный S-белок, достойны большего внимания, поскольку могут блокировать попадание SARS-CoV-2 в клетки хозяина. А учитывая то, что большинство вакцин индуцируют антителообразование именно к spike-белку, определение специфических IgG к этому антигену также дает возможность провести оценку наличия протективных антител после перенесенного заболевания или вакцинации против COVID-19.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgG, специфичных к spike-белку SARS-CoV-2, в тест-системе «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбирован рекомбинантный антиген – аналог spike-белка коронавируса SARS-CoV-2. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета, специфичные к S-белку SARS-CoV-2 антитела, если они присутствуют в образце, связываются с антигенами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Комплексы антиген-антитело выявляют добавлением раствора хромогена, содержащего 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Значение ОП, полученное для образца, позволяет выявить наличие или отсутствие антител к spike-белку SARS-CoV-2. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

Внутренние калибраторы тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» стандартизированы по Первому Международному Стандарту First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) code: 20/136 (NIBSC, Великобритания), который содержит 1000 BAU/mL (1000 единиц связывания антител в 1 мл).

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены – аналоги spike-белка коронавируса SARS-CoV-2. Лунки можно отделять.
PREDILUTION PLATE	1x96 лунок	Планшет для предварительного разведения сывороток
CAL 0	1x0.3 мл	Калибратор 0 Раствор альбумина с консервантом (желтый).
CAL 25	1x0.3 мл	Калибратор 25 Раствор специфических к spike-белку иммуноглобулинов в концентрации 25 BAU/mL со стабилизаторами и консервантом (зеленый).
CAL 50	1x0.3 мл	Калибратор 50 Раствор специфических к spike-белку иммуноглобулинов в концентрации 50 BAU/mL со стабилизаторами и консервантом (оранжевый).
CAL 100	1x0.3 мл	Калибратор 100 Раствор специфических к spike-белку иммуноглобулинов в концентрации 100 BAU/mL со стабилизаторами и консервантом (розовый).
CAL 200	1x0.3 мл	Калибратор 200 Раствор специфических к spike-белку иммуноглобулинов в концентрации 200 BAU/mL со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый).
CONTROL +	1x0.3 мл	Положительный контроль Раствор специфических к spike-белку иммуноглобулинов с известной концентрацией со стабилизаторами и консервантом (красный)
SAMPLE PREDILUENT	1x20 мл	Раствор для предварительного разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зеленый).
SAMPLE DILUENT	1x12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 мл	Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый).
TMB SOLUTION	1x12 мл	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный).
WASH TWEEN 20X	1x50 мл	Раствор для промывания Tw20 (20x концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).

STOP SOLUTION	1x12 мл	Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 М H ₂ SO ₄ (бесцветный).
---------------	---------	--

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

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

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- калибраторы и положительный контроль не содержат компонентов человеческого происхождения;

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121°C в течение 1 часа;
- утилизацию инактивированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и **CONJUGATE SOLUTION** на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоты, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае, кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

8.3. Предварительное разведение образцов, калибраторов и положительного контроля

Исследуемые образцы, калибраторы и положительный контроль предварительно развести в 10 раз [SAMPLE PREDILUENT]. Для этого в необходимое количество лунок [PREDILUTION PLATE] (комплектуются в наборе) внести по 90 мкл [SAMPLE PREDILUENT] и добавить по 10 мкл образцов, калибраторов и положительного контроля. При внесении образцов, калибраторов и контроля осторожно пипетировать смесь, при этом цвет раствора для предварительного разведения сывороток должен измениться с коричнево-зеленого на синий.

После разведения и переноса образцов использованные лунки [PREDILUTION PLATE] необходимо обеззаразить путем замачивания в дезинфицирующем растворе или автоклавированием.

Процедуру разведения образцов, калибраторов и положительного контроля следует проводить непосредственно перед анализом.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов, 1 лунку для положительного контроля и 5 лунок для калибраторов), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с калибраторами и положительным контролем обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункта 8.2.
- 9.4. Провести предварительное разведение образцов, калибраторов и положительного контроля в соответствии с пунктом 8.3.
- 9.5. Внести в лунки стрипов ИФА-планшета по 90 мкл [SAMPLE DILUENT].
- 9.6. Внести в лунки по 10 мкл предварительно разведенных калибраторов, положительного контроля и исследуемых образцов в следующем порядке: в лунки A1, B1, C1, D1, E1 и F1 – по 10 мкл разведенных 1:10 калибраторов [CAL 200], [CAL 100], [CAL 50], [CAL 25], [CAL 0] и [CONTROL +], соответственно; в остальные лунки – по 10 мкл разведенных 1:10 исследуемых образцов. Таким образом, конечное разведение образцов, калибраторов и положительного контроля в лунках ИФА-планшета должно составлять 1:100. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с желтого на зеленый.
- 9.7. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.8. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.9. В лунки стрипов внести по 100 мкл [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
- 9.10. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.8.
- 9.11. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.12. Инкубировать ИФА-планшет в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.13. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл [STOP SOLUTION], придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].

9.14. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратите внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

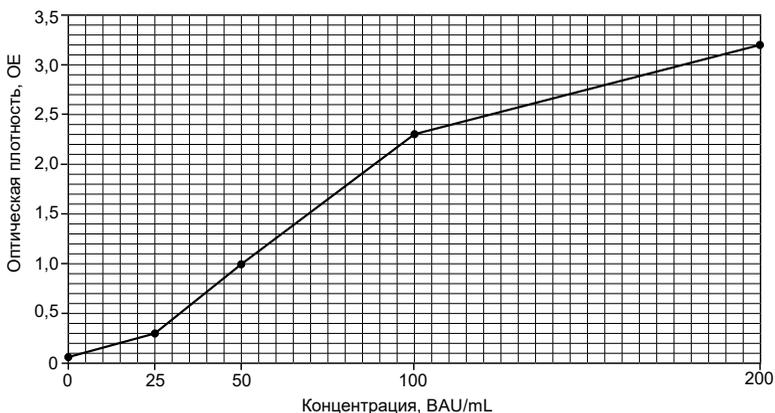
10.1. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CAL 0	OD ≤ 0,100
CAL 25	OD ≥ 0,120
CAL 200	OD ≥ 1,500
CONTROL +	В пределах диапазона концентраций, указанной на этикетке микропробирки с положительным контролем и в сертификате качества

10.2. Учет результатов анализа

Для определения концентрации антител класса IgG в BAU/mL построить калибровочный график: на оси OY отложить значение ОП калибраторов CAL 0, CAL 25, CAL 50, CAL 100, CAL 200, а на оси OX - соответствующие им концентрации - 0, 25, 50, 100, 200 BAU/mL, соответственно. С помощью калибровочного графика определите концентрацию специфических IgG (BAU/mL) в исследуемых образцах и положительном контроле, которая соответствует значению полученной оптической плотности.



Примечание: Не используйте этот график для определения концентрации специфических антител в Вашем анализе.

В случае, если оптическая плотность исследуемых образцов выше значения CAL 200, результат может быть выдан «> 200 BAU/mL». Такие образцы могут быть повторно исследованы в разведении 1:800. В этом случае, установленную по графику концентрацию специфических антител следует умножить на степень разведения 8:

$$\text{конечная концентрация} = \text{концентрация по графику} \times 8$$

Если при повторном исследовании в разведении 1:800 оптическая плотность исследуемых образцов все равно выше значения CAL 200 такие образцы рекомендовано повторно исследовать в разведении 1:1000 и 1:4000. В этом случае установленную по графику концентрацию специфических антител следует умножить на степень разведения 10 и 40 соответственно.

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

10.3. Интерпретация результатов

Концентрация IgG	Интерпретация
> 25 BAU/mL	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
20-25 BAU/mL	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
< 20 BAU/mL	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» на 352 образцах сывороток крови людей, которые были получены в первом полугодии 2019 года (до начала пандемии COVID-19) составила 100%.

Чувствительность тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike», исследованная на 49 образцах сывороток крови реконвалесцентов COVID-19 (полученные через 2-10 месяцев после перенесенного заболевания), составила 100%. Кроме того, при тестировании 18 образцов сывороток крови вакцинированных лиц, все образцы содержали антитела класса IgG к spike-белку в концентрации более 1000 BAU/mL.

Диагностические характеристики тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» также оценивали на верификационной панели «Anti-SARSCoV-2 Verification Panel for Serology Assays code: 20/B770» (производства NIBSC, Великобритания), которая состоит из 23 охарактеризованных образцов плазмы крови реконвалесцентов COVID-19, содержащих антитела к SARS-CoV-2, и 14 охарактеризованных образцов плазмы крови, не содержащих антитела к SARS-CoV-2. Чувствительность и специфичность тест-системы на данной панели составили 100%.

При исследовании образцов панели First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin code: 20/268 (производства NIBSC, Великобритания) в тест-системе «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» получены результаты, совпадающие с паспортными данным на панель.

11.2. Точность

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

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

№ образца	ОП _{сер}	Концентрация, BAU/mL	CV, %
783	0,671	35,9	5,5
977	2,222	92,3	7,5

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ образца	ОП _{сер}	Концентрация, BAU/mL	CV, %
783	0,643	34,8	5,3
977	2,143	93,4	6,9

11.3. Аналитическая чувствительность

“Граница определения” (LOD) - наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая определяется с заявленной вероятностью для тест-системы “Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike” составляет 3,5 BAU/mL.

11.4. Диапазон линейности

Диапазон линейности тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» находится в пределах 10-164 BAU/mL.

11.5 Соответствие калибраторов тест-системы Международному стандарту

Калибраторы тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike» соответствуют Первому Международному стандарту First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) code: 20/136 (NIBSC, Великобритания). Коэффициент детерминации (R²) составляет 0,99.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

В случае, если исследуемый образец получен в первые дни после инфицирования, то антитела класса IgG могут не определяться. Кроме того, поскольку данная тест-система выявляет специфические IgG только к одному из белков коронавируса (spike-белку), отрицательный результат не исключает инфицирование SARS-CoV-2. При наличии клинических симптомов необходимо провести повторное тестирование пациента через 1-2 недели.

Также с осторожностью следует интерпретировать отрицательные результаты исследований у лиц с иммуносупрессией.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Juanjuan Zhao Jr., Quan Yuan et. al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019.// *Clinical Infectious Diseases.*, - 2020 Mar. 20 doi: 10.1093/cid/ciaa344.
2. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases // WHO. Interim guidance 19 March 2020. WHO reference number: WHO/COVID-19/laboratory/2020.5.
3. Marco Cascella ; Michael Rajnik et.al. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). // NCBI Bookshelf. StatPearls Publishing; 2020 – P.16.
4. Patrick C. Y. Woo, Susanna K. P. Lau. et.al. Differential Sensitivities of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Spike Polypeptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein ELISA for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. // *J. Clin. Microbiol.*, - 2005 – V. 43 N.7 - p. 3054–3058.
5. Quan-Xin Long, Bai-Zhong Liu et. al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19.// *Nature Medicine.*, - 2020 April 29 doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
6. Quan-xin Long, Hai-jun Deng et.al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. // medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038018>.
7. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel corona virus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. // *J Med Virol.*, - 2020 - 92(5) – p.464-467. doi: 10.1002/jmv.25702. Epub 2020 Feb 17.
8. Wu, L.-P., Wang, N.-C. et.al. (2007). Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome. // *Emerging Infectious Diseases.*, - 2007 - 13(10) - p.1562-1564.
9. Bao Y., Ling Y., Chen Y. et. al. Dynamic anti-spike protein antibody profiles in COVID-19 patients.// *International Journal of Infectious Diseases.*- 103 (2021) - p.540–548.
10. Brochot E., Demey B. et. al. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals.// *Front. Microbiol.*, 19 October 2020/<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584251>

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

Inst_SARS-CoV-2-IgG_QuantiSpike_TK040_V02

Редакция 2 от 29.03.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



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



Vitrotest Europe Sp. z O.O.
ul. Krakowska 139-141, 50-428, Wrocław, Poland
tel.: +48-88-2950379,
e-mail: info@vitrotest.pl, www.vitrotest.pl



Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike™

СХЕМА АНАЛИЗА



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



В лунки **PREDILUTION PLATE** внести по 90µl **SAMPE PREDILUENT** (коричнево-зелёный цвет) и по 10µl калибраторов, положительного контроля и образцов (цвет меняется с коричнево-зелёного на синий)



Внести в лунки **ELISA STRIPS** по 90µl **SAMPLE DILUENT** (жёлтый цвет) и по 10µl предварительно разведённых калибраторов, положительного контроля и образцов соответственно:

A1, B1, C1, D1, E1, F1 - **CAL 200**, **CAL 100**, **CAL 50**, **CAL 25**, **CAL 0** и **CONTROL +**.

G1 и остальные лунки – исследуемые образцы (цвет меняется с жёлтого на зелёный)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



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



Внести по 100µl **CONJUGATE SOLUTION** в каждую лунку (фиолетовый цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



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



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



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



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



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

Построить калибровочный график, определить концентрацию ВАУ/мл специфичных к spike-белку коронавируса SARS-CoV-2 антител класса IgG в исследуемых образцах.

Провести учёт результатов анализа соответственно таблице:

Концентрация IgG	Интерпретация
> 25 ВАУ/мл	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
20-25 ВАУ/мл	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
< 20 ВАУ/мл	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM

Иммуноферментная тест-система для качественного определения анти-тел класса IgM к коронавирусу SARS-CoV-2

ТК034

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» предназначена для качественного определения антител класса IgM к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Коронавирусная инфекция COVID-19 - это инфекционное заболевание, вызываемое новым коронавирусом SARS-CoV-2, который раньше у людей не обнаруживался.

Влияние этого вируса приводит к развитию респираторного гриппоподобного заболевания с такими симптомами как кашель, лихорадка, в более тяжелых случаях развивается пневмония. Средний инкубационный период при COVID-19 составляет 6,5 суток, а его крайние сроки - от 3 до 21 суток.

Коронавирус SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом с характерной оболочкой с отростками в виде «короны». К основным структурным белкам вируса принадлежит белок нуклеокапсида и трансмембранный S (spike)-белок с рецепторсвязывающим доменом (RBD), который связывается с рецепторами клеток человека ACE2, вызывая инфицирование эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей. Оба белка являются высокоиммуногенными антигенами для человека.

В организме инфицированного человека специфические антитела (IgM, IgA, IgG) против вируса появляются на 7-11-й дни с момента попадания/контакта организма с вирусом. Anti-SARS-CoV-2 IgM антитела могут быть обнаружены начиная с 4 дня от первых симптомов болезни. У пациентов с COVID-19 в течение первой недели появления симптомов специфические антитела выявляются менее чем у 40% пациентов. Уровни этих антител быстро увеличиваются и к концу второй недели клинических проявлений выявляются почти у всех. На 20 день от появления симптомов COVID-19 вирус специфические IgG обнаруживаются практически у 100% пациентов (кроме лиц с иммуносупрессией).

По некоторым научным данным отмечается четкая корреляция между тяжестью болезни и уровнем специфических IgG в крови на второй неделе клинических проявлений.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM, специфичных к SARS-CoV-2, в тест-системе «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» базируется на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулину класса IgM человека. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета иммуноглобулины класса IgM, при условии присутствия в образцах, связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется смесь конъюгатов рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена, которые связываются со специфическими IgM в составе образованных иммунных комплексов на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена, содержащего 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и перекиси водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулину класса IgM человека. Лунки можно отделять.
CONTROL +	1x0,3 мл	Положительный контроль Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый)
CONTROL -	1x0,5 мл	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x 12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).

CONJUGATE SOLUTION	1x 12 мл	Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый).
TMB SOLUTION	1x 12 мл	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный).
WASH TWEEN 20X	1x 50 мл	Раствор для промывания Tw20 (20x концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твин-ом-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x 12 мл	Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 М H ₂ SO ₄ (бесцветный).

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

Примечание: допускается использование [WASH TWEEN 20X], [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] и [SAMPLE PREDILUENT] других серий.

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

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

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре, или гипохлорит-

- том натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121°C в течение 1 часа;
 - утилизацию инактивированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству;
 - не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
 - некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] и [CONJUGATE SOLUTION] на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
 - в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок [ELISA STRIPS] для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 мкл [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 10 мкл контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL -]. В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с фиолетового на синий.

- 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
- удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. В лунки внести по 100 мкл **CONJUGATE SOLUTION**. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл **TMB SOLUTION** в лунки.
- 9.11. Инкубировать стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл **STOP SOLUTION**, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **TMB SOLUTION**.
- 9.13. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратить внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

$$N_c = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = Nc + 0.2; \quad IP_{sample} = OD_{sample} / CO; \quad \text{где } OD_{sample} - \text{ОП}_{образца}$$

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

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

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

При оценке чувствительности тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» на 52-х образцах сывороток крови людей с подтвержденным ПЦР диагнозом COVID-19 (на 1-10 день с момента госпитализации) специфические антитела класса IgM были обнаружены в 36 образцах, 6 из которых были отрицательными на антитела класса IgG к SARS-CoV-2.

В результате исследования 273 образцов сывороток крови людей, которые были получены в течение первого полугодия 2019 (до начала пандемии COVID-19), специфичность тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM» составила 99,3%.

11.2. Точность

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

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

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
85	0.899	4.03	3.0
119	1.719	7.71	3.6

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
85	0.887	3.95	3.3
119	1.704	7.58	3.4

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

В случае, если исследуемый образец получен в первые дни после инфицирования, то антитела класса IgM могут не выявляться. Поэтому отрицательный результат исследования антител класса IgM к коронавирусу SARS CoV-2 не исключает инфицирования пациента вирусом. При наличии клинических симптомов необходимо провести повторное тестирование пациента через 1 неделю в тест-системах «Vitrotest SARS-CoV-2 IgM», «Vitrotest SARS-CoV-2 IgA» и «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG».

Также с осторожностью следует интерпретировать отрицательные результаты исследований у лиц с иммуносупрессией.

Окончательный диагноз не может быть установлен только на основании результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать эпидемиологический анамнез пациента, клинические проявления заболевания, а также результаты других лабораторных тестов (в частности, ПЦР исследования).

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

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

Сокращено время инкубации на одном из этапов

Проводить инкубацию согласно инструкции по применению

Интенсивность окрашивания лунок не отвечает полученной ОП

Смещен оптический луч

Проверить корректность работы ридера

ЛИТЕРАТУРА

1. Juanjuan Zhao Jr., Quan Yuan et. al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. // Clinical Infectious Diseases., - 2020 Mar. 20 doi:10.1093/cid/ciaa344.
2. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases // WHO. Interim guidance 19 March 2020. WHO reference number: WHO/COVID-19/laboratory/2020.5.
3. Marco Cascella ; Michael Rajnik et.al. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). // NCBI Bookshelf. StatPearls Publishing; 2020 – P.16.
4. Patrick C. Y. Woo, Susanna K. P. Lau. et.al. Differential Sensitivities of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Spike Polypeptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein ELISA for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. // J. Clin. Microbiol., - 2005 – V. 43 N.7 - p. 3054–3058.
5. Quan-Xin Long, Bai-Zhong Luet et. al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. // Nature Medicine., - 2020 April 29 doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
6. Quan-xin Long, Hai-jun Deng et.al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. // medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038018>.
7. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel corona virus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. // J Med Virol., - 2020 - 92(5) – p.464-467. doi: 10.1002/jmv.25702. Epub 2020 Feb 17.
8. Wu, L.-P., Wang, N.-C. et.al. (2007). Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome. // Emerging Infectious Diseases, - 2007 - 13(10) - p.1562-1564.



Catalogue number / Номер по каталогу



Consult instructions for use / Обратитесь к инструкции по применению



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



Manufacturer / Производитель



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



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



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



Temperature limitation / Температурный диапазон



Batch code / Код партии



Use by / Использовать до



Date of manufacture /Дата изготовления



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



Authorized representative in the European Community / Уполномоченный представитель в ЕС

Inst_SARS-CoV-2_IgM_TK034_V03
Edition 3rd, 02.07.2020.

Редакция 3 от 02.07.2020г.

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

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103, Украина
tel.: +38(044)222-76-72,

e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua

Vitrotest Sp. z O.O.

Grunwaldzka Al. 472, Gdansk, 80-309, Poland

tel.: +48-88-2950379, e-mail: info@vitrotest.pl

