



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-TK030

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>Giardia lamblia</i> (<i>intestinalis</i>) «Vitrotest Anti-Lamblia»	TK030

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-TK058

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>Toxocara canis</i> «Vitrotest Anti-Toxocara»	TK058

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.

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

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

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

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

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

Vitrotest® Anti-HBcore

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В

TK018
96 аналізів

**1. ПРИЗНАЧЕННЯ**

Імуноферментна тест-система Vitrotest® Anti-HBcore призначена для виявлення антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В 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

Вірус гепатиту В (ВГВ) є оболонковим вірусом родини *Hepadnaviridae*, що містить ДНК. Гепатит В (ІВ) має тривалий інкубаційний період 45-160 днів (в середньому 120 днів). Наявність симптомів при гострому ГВ зворотно корелює з віком: менш ніж 1% новонароджених та 30–50% дорослих мають симптоми ГВ. Особи з симптомами, які є загальними для всіх типів вірусного гепатиту, зазвичай страждають від втоми, втрати апетиту, неприємних відчуттів у шлунку, нудоти, блювоти, лихоманки та жовтухи. У менш ніж 1% випадків, особливо в осіб похилого віку, розвивається блискавичний гепатит, який у більшості випадків є смертельним наслідком гострого некрозу печінки.

Гострий ГВ часто завершується спонтанно після 4-8-тижневої хвороби. В інших випадках захворювання триває 6 місяців або більше. Цей стан відомий як хронічний ГВ. Хронічна інфекція виникає більш ніж у 90% інфікованих новонароджених, 25–50% дітей, інфікованих у віці 1-5 років, і 6–10% дітей старших за 5 років та дорослих. У значного числа пацієнтів хронічний ГВ призводить до цирозу печінки та карциноми.

Перенесення вірусу відбувається внаслідок контакту пошкодженої шкіри та слизових оболонок з заразними рідинами організму, такими як кров, вагінальні та менструальні рідини, сім'я. Основні шляхи передачі включають: вертикальний – від інфікованої матері при пологах (рівень передачі близько 50%); статевий; горизонтальний – побутовий контакт з інфікованою особою (наприклад, контакт інфекційної крові з подряпинами на шкірі).

При клінічному лабораторному аналізі різних форм вірусного гепатиту В виявляють низку серологічних маркерів цієї хвороби – структурні антигени вірусу (HBs-антиген та HBe-антиген), а також специфічні антитіла класів IgM та IgG до HBcore-антигену, антитіла класу IgG до HBs- та HBe-антигенів.

Першими серологічними маркерами, які спостерігаються у осіб з гострою ВГВ інфекцією, є HBsAg та антитіла до корового антигену ВГВ. Ці маркери з'являються під час інкубаційного періоду через 3-6 тижнів після інфікування. Антитіла IgG та IgM до HBcore з'являються пізніше та майже одночасно. У осіб, які одужують після ВГВ інфекції, HBsAg поступово елімінується з крові, і приблизно через 6 місяців після інфекції з'являються анти-HBs антитіла. Приблизно в той же час припиняють визначатися антитіла IgM до HBcore. Анти-HBcore IgG персистують протягом усього життя. Згідно з даними ВООЗ, наявність анти-HBs антитіл на рівні 10 mMO/ml і вище є надійним показником розвитку протективного імунітету.

Незважаючи на впровадження молекулярних методів, серологічні тести залишаються основою діагностики ГВ. Біохімічні проби, особливо ті, що вимірюють підвищення активності сироваткових трансамінз (амінотрансфераз), можуть надавати допоміжну інформацію. Відповідно до визначення ВООЗ, діагноз ГВ вважається підтвердженням, якщо тести на HBsAg або anti-HBcore IgM – позитивні, а тести на anti-HAV IgM – негативні.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Виявлення специфічних до корового антигену вірусу гепатиту В антитіл у тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА у двоетапній інкубації. У лунках планшету засорбовано рекомбінантний HBcore антиген вірусу гепатиту В. На першому етапі під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування, за наявності у зразках, специфічних до HBcore антигену антитіл з антигенами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додається кон'югат антивидових анти-IgG та 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 30 min інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту і оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрії при довжині хвилі 450/620-695 nm. Значення ОГ, отримане для зразка, дозволяє виявити наявність або відсутність антитіл до HBcore антигена. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл, зв'язаних з антигенами на твердій фазі.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ІФА-планшет У кожній лунці планшета засорбовано рекомбінантний HBeAg антиген вірусу гепатиту В. Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,5 ml	Позитивний контроль Розчин специфічних імуноглобулінів з консервантом (рожевий).
CONTROL -	1x1,0 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий).
SAMPLE DILUENT	1x10 ml	Розчин для розведення сироваток Буферний розчин з детергентом та консервантом (коричнево-зелений).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Розчин кон'югату Буферний розчин моноклональних антитіл до IgG та IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (зелений), 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) та інструкція з використання.

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 та 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 вищезагаданих застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання спектрофотометра).

5.2. Заходи безпеки

- 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;
- позитивний та негативний контролю тест-системи Vitrotest® Anti-HBcore не містять компонентів людського походження;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потрапленні **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 автокладувати 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 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 об./min 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

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.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- 9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири 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. Внести в усі лунки планшета по 80 µl [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 20 µl контролів та досліджуваних зразків: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 та D1 – [CONTROL -], в решту лунок – досліджувані зразки. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення, відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій.
- 9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.
- 9.7. 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 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.
- 9.8. В лунки внести по 100 µl [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.
- 9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в п. 9.7.
- 9.10. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.11. Інкубувати стрипи протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.
- 9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION], дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні [TMB SOLUTION].
- 9.13. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання слід переконавшись у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результатів аналізу можна проводити в одноканальному 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}):

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

$$CO = Nc + 0,25$$

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

CONTROL +	$OG \geq 1,5$
CONTROL -	$OG \leq 0,150$
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

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

$OD_{sample} > CO,$ де $OD_{sample} - OG_{зразка}$	ПОЗИТИВНИЙ*
$OD_{sample} < CO$	НЕГАТИВНИЙ**

*Зразки зі значенням оптичної густини вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи Vitrotest® Anti-HBcore. Після повторного тестування **ПОЗИТИВНИМИ** в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore вважаються зразки, оптична густина котрих хоча б в одному з повторів була вищою або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні оптична густина зразка в обох повторах була нижче граничного значення, такий зразок вважати негативним.

Зразки зі значенням оптичної густини нижче граничного значення вважаються **негативними в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore. Однак результати в межах 10 % нижче граничного значення слід інтерпретувати з обережністю (рекомендується повторно дослідити такі зразки в двох лунках тест-системи).

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість та специфічність тест-системи Vitrotest® Anti-HBcore оцінювали з використанням комерційної панелі сироваток крові людини «Контроль АТ(+/-)HBcoreAg-МБА» виробництва ТОВ «МедБіоАльянс» (Україна), що складається з 8 охарактеризованих зразків. В тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore всі позитивні зразки визначені як позитивні, негативні – як негативні.

Також в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore були протестовані контрольні зразки QCRTHBcQC1 - Total Anti-HBc Quality Control Serum Sample 1 NIBSC code: 16/B704-02, QCRTHBcQC2 - Total Anti-HBc Quality Control Serum Sample 2 NIBSC code: 14/B651-04, QCRHBcIgMQC1 - IgM Anti-HBc Quality Control Serum Reagent Sample 1 NIBSC code: 07/B498 виробництва NIBSC (Великобританія) та визначені як позитивні відповідно до паспортних даних.

При дослідженні 76 зразків сироваток крові хворих на гепатит В в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore, в усіх зразках було виявлено антитіла до корового антигена вірусу гепатиту В, чутливість склала 100 %. Крім того, в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore було досліджено 304 зразки сироваток крові клінічно здорових донорів, серед яких у 9 зразках було виявлено антитіла до корового антигена вірусу гепатиту В. В подальших дослідженнях у цих 9 зразках були також виявлені антитіла до поверхневого антигена вірусу гепатиту В.

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 повторах на одній серії тест-системи.

N° зразку	ОГ _{сер}	CV, %
950	0,467	8,4
5s	1,645	7,0

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.

N° зразку	ОГ _{сер}	CV, %
950	0,438	6,4
5s	1,665	5,5

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Інтерпретація результатів повинна проводитися з урахуванням клінічних проявів та даних комплексу лабораторних досліджень. Для діагностики гострого, хронічного або перенесеного гепатиту В, оцінки ефективності терапії рекомендується додатково провести дослідження зразка на інші маркери ВГВ, виявлення ДНК та оцінку біохімічних показників крові пацієнта.

Позитивний результат у тест-системі Vitrotest® Anti-HBscore є свідченням наявності у пацієнта антитіл до корового антигена вірусу гепатиту В.

Негативний результат в тест-системі Vitrotest® Anti-HBscore не виключає інфікування ВГВ пацієнта, особливо на ранніх стадіях ВГВ інфекції.

Антитіла до корового антигена вірусу гепатиту В не є показником протективного імунітету. Виявлення антитіл до HBscore антигена у пацієнта не є доказом наявності вірусу гепатиту В в організмі, ці антитіла виявляються при гострому, хронічному та перенесеному в анамнезі гепатиті В. Для коректної діагностики гепатиту В рекомендується провести дослідження зразка на наявність HBsAg та антитіл до HBsAg (наприклад, у тест-системах Vitrotest® HBsAg та Vitrotest® Anti-HBs, відповідно).

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів 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

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // Clinical Microbiology Review – 1999 – Vol.12, N° 2 - p. 351–366
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // Clin. Lab. - 2001. - V. 47, N 1-2. - P. 51-55.
3. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // Postgrad. Med. J. - 2001. - V. 77. - P. 498-505.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення $<n>$ кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

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	секунда хвилина година	s min h	с хв год
Довжина	сантиметр нанометр міліметр	cm nm mm	см нм мм
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_Anti-HBcore_TK018_V01
Редакція Інструкції № 1 від 02.08.2021 р.

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)

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



UA.TR.099

Vitrotest® Anti-HBcore

СХЕМА АНАЛІЗУ



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



Внести 80 µl [SAMPLE DILUENT] в лунки стрипів
(коричнево-зелений)



Внести 20 µl контролів та зразків у лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 та інші лунки – досліджувані зразки

(колір змінюється з коричнево-зеленого на синій)



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



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



Додати 100 µl [CONJUGATE SOLUTION] в кожную лунку
(зелений колір)



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



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



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в кожную лунку



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °С



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



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

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

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

Nc - середнє значення ОГ з [CONTROL -],
CO - граничне значення

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$OD_{sample} > CO,$ де $OD_{sample} - OG_{зразка}$	ПОЗИТИВНИЙ
$OD_{sample} < CO$	НЕГАТИВНИЙ

Vitrotest® Anti-HCV

Імуноферментна тест-система для виявлення сумарних антитіл до вірусу гепатиту С

TK060
192 аналізи



1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментна тест-система Vitrotest® Anti-HCV призначена для виявлення сумарних антитіл до вірусу гепатиту С (ВГС) 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

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, близько 150 мільйонів людей хронічно інфіковані вірусом гепатиту С і щорічно більше 350 тисяч осіб вмирають від пов'язаних з гепатитом С хвороб печінки. Захворювання може мати гострий або хронічний перебіг, при цьому найчастіше протікає без виражених симптомів. Однак, хронізація інфекції призводить до цирозу печінки та розвитку гепатоцелюлярної карциноми.

Збудником гепатиту С є маленький вкритий оболонкою вірус (50 nm в діаметрі), що містить одноланцюгову РНК, належить до родини флавівірусів. В складі геному ВГС виділяють зони, що кодують структурні та неструктурні білки. До структурних антигенів вірусу належать нуклеокаспидний білок – core та два білки зовнішньої оболонки – E1 і E2. Неструктурні білки представлені комплексом білків з ферментативною активністю – NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a та NS5b. У відповідь на інфікування вірусом в організмі людини продукуються специфічні антитіла до всіх білків вірусу.

Сучасна лабораторна діагностика гепатиту С базується на виявленні специфічних маркерів інфікування ВГС: антигенів вірусу, антитіл до вірусних білків та РНК вірусу в біологічних рідинах організму. Найбільш раннім маркером ВГС-інфекції є вірусна РНК, яка виявляється в крові інфікованого через 2-6 тижнів від моменту інфікування. Через один-два тижні у крові виявляється core антиген вірусу гепатиту С. На 6-8 тижні організмом продукуються специфічні антитіла класу IgM. Як при гострому, так і при хронічному гепатиті С ці антитіла можуть виявлятися тривалий час і являються маркером активної вірусної реплікації. Низькі титри анти-ВГС IgM антитіл виявляються у 50-80 % випадків хронічного гепатиту С. У більшості інфікованих антитіла класу IgG спочатку з'являються до епітопів білків core та NS3, і лише пізніше (через 20-22 тижні після інфікування) до NS4. Окрім того, інтенсивність продукції антитіл до білку NS4 у деяких генотипів ВГС нижче, в той же час кількість антитіл до білків core та NS3 висока для всіх генотипів.

На сьогоднішній день з метою первинної діагностики вірусного гепатиту С та тестування донорської крові для виявлення специфічних до ВГС антитіл переважно застосовують ІФА, в якому використовуються рекомбінантні білки core, NS3, NS4 та NS5.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Виявлення антитіл, специфічних до ВГС, в тест-системі Vitrotest® Anti-HCV базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА у двоетапній інкубації. В лунках планшету засорбовані рекомбінантні антигени вірусу гепатиту С core, NS3, NS4 та NS5. Під час першого етапу інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета, специфічні до ВГС антитіла, якщо вони присутні, зв'язуються з антигенами на твердій фазі. Лунки відмиваються для видалення нез'язаних антитіл, залишаються лише специфічні комплекси антиген-антитіло. Після цього додається суміш кон'югатів антивидових (анти-IgG та анти-IgM) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, які зв'язуються з імунами 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 30 min інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту. Оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm. Значення ОГ, отримане для зразка, дозволяє виявити наявність або відсутність антитіл до ВГС. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл, зв'язаних з антигенами на твердій фазі.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	2x96 лунок	ІФА-планшет В кожній лунці планшету засорбовані рекомбінантні антигени ВГС core, NS3, NS4 та NS5. Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,7 ml	Позитивний контроль Розчин специфічних імуноглобулінів з консервантом (рожевий).
CONTROL -	1x1,8 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий).
SAMPLE DILUENT	1x20 ml	Розчин для розведення сироваток Буферний розчин з детергентом та консервантом (коричнево-зелений).
CONJUGATE SOLUTION	1x22 ml	Розчин кон'югату Буферний розчин моноклональних антитіл до IgG та IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, зі стабілізаторами та консервантом (зелений), готовий до використання.
TMB SOLUTION	1x22 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.
WASH TWEEN 20X	1x80 ml	Розчин для промивання Tw (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x22 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

Клейка плівка (4), бланк внесення проб (2) та інструкція з використання.

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 та 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 чи-

стий, 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 спектрофотометру).

5.2. Заходи безпеки

- 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;
- позитивний та негативний контролі тест-системи Vitrotest® Anti-HCV не містять компонентів людського походження;
- 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 кислоти 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 автоклавувати 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-відтаування досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільнити зразок від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./min протягом 10-15 хmin. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) з вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактеріальним проростом. На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,1 mg/ml (17,3 µmol/l), гемоглобіну в концентрації до 5 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

Для попередження конденсації води в лунках слід відкривати **ELISA STRIPS** лише після витримання 30 min за кімнатної температури. Потім розкривати 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 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 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.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- 9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири 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. Внести в усі лунки планшета по 80 μ l [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 40 μ l контролів та досліджуваних зразків: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 та D1 – [CONTROL -], в решту лунок – досліджувані зразки. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. Під час внесення зразків відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на синій.
- 9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 60 min при температурі 37 °C.
- 9.7. 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 не менш ніж по 300 μ l 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 μ l;
 - повторити процедуру промивання ще чотири рази;
 - після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.
- 9.8. В лунки внести по 100 μ l [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин за температури 37 °C.
- 9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в п. 9.7.
- 9.10. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 μ l [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.11. Інкубувати стрипи протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.
- 9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 μ l [STOP SOLUTION], дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні [TMB SOLUTION].
- 9.13. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620–695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання слід переконатися у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результату 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. Облік результатів аналізу

Розрахувати середнє значення ОГ негативного контролю (Nc) та рівень граничного значення (Cut off - CO).

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

$$CO = Nc + 0,3$$

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

[CONTROL +]	ОГ \geq 1,500
[CONTROL -]	ОГ \leq 0,100
[CONTROL -]	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

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

$OD_{\text{sample}} > CO$, де $OD_{\text{sample}} - OG_{\text{зразка}}$	ПОЗИТИВНИЙ*
$0,9 \times CO \leq OD_{\text{sample}} \leq CO$	НЕВИЗНАЧЕНИЙ**
$OD_{\text{sample}} < 0,9 \times CO$	НЕГАТИВНИЙ

*Зразки із значенням OG вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи Vitrotest® Anti-HCV. Після повторного тестування **позитивними** вважаються зразки, OG котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні OG зразка в обох повторах була нижче граничного значення такий зразок вважається **негативним**.

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

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість та специфічність тест-системи Vitrotest® Anti-HCV оцінювали за допомогою комерційної панелі «Стандарт АТ(+/-)ВГС-МБА» виробництва ТОВ «МедБіоАльянс» (Україна). В тест-системі Vitrotest® Anti-HCV всі позитивні та негативні зразки визначались коректно, відповідно до паспортних даних панелі.

При дослідженні 161 зразка сироваток крові пацієнтів, хворих на гепатит С, в тест-системі Vitrotest® Anti-HCV всі зразки були визначені позитивними, чутливість склала 100 %. Крім того, в тест-системі Vitrotest® Anti-HCV було досліджено 299 зразків сироваток крові клінічно здорових донорів, серед яких не було виявлено хибнопозитивних результатів, специфічність склала 100 %.

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 повторах на одній постановці тест-системи.

№ сироватки	$OG_{\text{сеп}}$	CV, %
182L	0,705	7,8
1172L	1,441	6,5

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.

№ сироватки	$OG_{\text{сеп}}$	CV, %
182L	0,688	7,1
1172L	1,432	7,0

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Для діагностики гострого, хронічного або перенесеного гепатиту С, оцінки ефективності терапії рекомендується додатково провести дослідження зразка на наявність антитіл до окремих білків ВГС та анти-ВГС IgM антитіл (наприклад, у тест-системах Vitrotest® Anti-HCV Different та Vitrotest® HCV-IgM, відповідно), РНК ВГС та оцінити біохімічні показники сироватки крові.

Сучасні методи виявлення антитіл до ВГС не можуть забезпечити виявлення всіх інфікованих пацієнтів. Негативний результат не виключає інфікування вірусом гепатиту С пацієнта, особливо, якщо він проходить імуносупресивне лікування або інфікований ВІЛ, а також на ранніх стадіях гепатитної інфекції.

Будь-який з методів ІФА може допустити хибнопозитивну реакцію. Для виключення хибнопозитивних результатів рекомендується провести верифікаційне дослідження з визначенням антитіл до окремих білків ВГС та РНК вірусу гепатиту С.

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів 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 М Ω -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

1. Brillanti S., Masci C., Miglioli M. and Barbara L. Serum IgM antibodies to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. // Archives of virology supplementum. - 1993. – N8. – P.213-218.
2. Casno C., Lilli D., Rivanera D., et. al. Diagnostic value of anti-hepatitis C virus (HCV) core immunoglobulin M in recurrence of HCV infection after orthotropic liver transplantation. // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. – V.37. – N.8. – P.2726-2728.
3. Dal Molin G., Tiribelli C. Campello C. A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Annals of hepatology. - 2003. – N2. – P.76-83.
4. Richter S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Journal of Clinical Microbiology. - 2002. – V.40. – N.12. – P.4407-4412.
5. Urdea M.S., Wuestehube L.J., Laurenson P.M., and Wilber J.C. Hepatitis C – diagnosis and monitoring. // Clinical Chemistry. - 1997. – V.43. – N.8. – P.1507-1511.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення <n> кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

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	секунда	s	с
	хвилина	min	хв
	година	h	год
Довжина	сантиметр	cm	см
	нанометр	nm	нм
	міліметр	mm	мм
Об'єм, місткість	літр	l	л
	мілілітр	ml	мл
	мікролітр	µl	мкл
Кількість речовини	моль	mol	моль
	мілімоль	mmol	млмоль
	мікромоль	µmol	мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
	нанограм	ng	нг
	мікрограм	µg	мкг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Anti-HCV_TK060_V01

Редакція Інструкції № 1 від 06.08.2021 р.

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)

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



UA.TR.099

Vitrotest® Anti-HCV

СХЕМА АНАЛІЗУ



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



Внести 80 µl **SAMPLE DILUENT** в лунки стрипів
(коричнево-зелений)



Внести 40 µl контролів та зразків у лунки:

A1 – **CONTROL +**,

B1, C1, D1 – **CONTROL -**,

E1 та інші лунки – досліджувані зразки

(колір змінюється з коричнево-зеленого на синій)



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 60 min при 37 °С



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



Додати 100 µl **CONJUGATE SOLUTION** в кожную лунку
(зелений колір)



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



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



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °С



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



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

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

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

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

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$OD_{sample} > CO,$ де OD_{sample} – ОГ зразка	ПОЗИТИВНИЙ*
$0,9 \times CO \leq OD_{sample} \leq CO$	НЕВИЗНАЧЕНИЙ**
$OD_{sample} < 0,9 \times CO$	НЕГАТИВНИЙ

Vitrotest® Anti-Lamblia

ELISA test-kit for the detection of antibodies to *Giardia lamblia* (*intestinalis*)

TK030

96 tests

1. INTENDED USE

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

2. CLINICAL VALUE

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

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

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

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

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

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

4.2. Material required but not provided

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

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

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

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

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

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

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

5.2. Safety

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

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

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

6. STORAGE AND STABILITY

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

7. SPECIMEN COLLECTION

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

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. [ELISA STRIPS] preparation

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

8.2. Washing solution preparation

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

9. ASSAY PROCEDURE

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

9.12. Dispense 100 µl [STOP SOLUTION] into all wells in the same order and at the same rate as for [TMB SOLUTION].

9.13. Read the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm using a microplate reader within 5 minutes after adding the [STOP SOLUTION]. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and absence of bubbles in the wells before reading.

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

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

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

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

10.2. Validation of the test

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

[CONTROL +]	OD ≥ 1.200
[CONTROL -]	OD ≤ 0.150
[CONTROL -]	Nc × 0.5 ≤ Ncn ≤ Nc × 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 ≤ IP _{sample} ≤ 1.1	DOUBTFUL*
IP _{sample} < 0.9	NEGATIVE

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

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

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

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

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

Inter assay reproducibility

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

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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














13. TROUBLESHOOTING

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

13. REFERENCE

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

SYMBOLS

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

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

Edition 1st, 12.09.2019.

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



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



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

ASSAY PROCEDURE



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



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



Dispense 10µl of controls and samples into the wells:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 and other wells – patient samples

(colour changes from violet to blue)



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



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



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



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



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



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



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



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



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

CALCULATION

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

$$CO = Nc + 0.25;$$

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

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

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

Vitrotest® Anti-Toxocara

ELISA test-kit for the detection of antibodies to *Toxocara canis*

TK058

96 tests

1. INTENDED USE

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

2. CLINICAL VALUE

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

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

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

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test-kit

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

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

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

4.2. Material required but not provided

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

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

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

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

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

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

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

5.2. Safety

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

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

6. STORAGE AND STABILITY

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

7. SPECIMEN COLLECTION

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

8. REAGENT PREPARATION

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

8.1. ELISA STRIPS preparation

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

8.2. Washing solution preparation

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

9. ASSAY PROCEDURE

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

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

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

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

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

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

10.2. Validation of the test

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

[CONTROL +]	OD ≥ 1.200
[CONTROL -]	OD ≤ 0.150
[CONTROL -]	Nc × 0.5 ≤ Ncn ≤ Nc × 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 ≤ IP _{sample} ≤ 1.1	DOUBTFUL*
IP _{sample} < 0.9	NEGATIVE

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

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

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

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

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

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

Inter assay reproducibility

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

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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

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














13. TROUBLESHOOTING

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

REFERENCE

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

SYMBOLS

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

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

Edition 1st, 12.09.2019.

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



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



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



ASSAY PROCEDURE



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



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



Dispense 10µl of controls and samples into the wells:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 and other wells – patient samples

(colour changes from brown-green to blue)



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



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



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



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



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



Add 100µl of [TMB SOLUTION] into the wells



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



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



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

CALCULATION

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

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

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. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментна тест-система Vitrotest® HBsAg призначена для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) 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

Вірус гепатиту В (ВГВ) є оболонковим вірусом родини *Нерадnaviridae*, що містить ДНК. Гепатит В (ГВ) має тривалий інкубаційний період у 45-160 днів (в середньому 120 днів). Основними симптомами хвороби є: втома, втрата апетиту, неприємні відчуття у шлунку, нудота, блювота, лихоманка та жовтуха. Гострий ГВ часто завершується спонтанно після 4-8-тижневої хвороби. В інших випадках захворювання триває 6 місяців або більше. Цей стан відомий як хронічний ГВ.

Хронічна інфекція виникає більш, ніж у 90 % інфікованих новонароджених, 25–50 % дітей, інфікованих у віці 1-5 років, і 6–10 % дітей старших за 5 років та дорослих. Як наслідок, понад 350 мільйонів людей у світі постійно інфіковані ВГВ. У значного числа пацієнтів хронічний ГВ призводить до цирозу печінки та карциноми. Цироз виникає у приблизно одного з п'яти людей з хронічним ГВ. Перенесення вірусу відбувається внаслідок контакту пошкодженої шкіри та слизових оболонок з заразними рідинами організму, такими, як кров, вагінальні та менструальні рідини, сім'я.

При клінічному лабораторному аналізі різних форм вірусного гепатиту В виявляють низку серологічних маркерів цієї хвороби – структурні антигени вірусу (HBs-антиген та HBe-антиген), а також специфічні антитіла класу IgM та IgG до HBe-антигену та антитіла класу IgG до HBs- та HBe-антигенів. HBsAg – основний маркер інфікування вірусом гепатиту В є структурним білком, що відповідає за адсорбцію вірусу на клітинах гепатоцитів. Це перший маркер, що з'являється в крові через 3-5 тижнів з моменту інфікування, до появи клінічних симптомів і при гострому гепатиті виявляється ще протягом кількох місяців і досить високою концентрацією. При сприятливому перебігу хвороби HBsAg зникає через 4-6 місяців після зараження. Якщо цього не відбувається, діагностують хронічний гепатит. Концентрація HBsAg в сироватці крові хворих на вірусний гепатит В може коливатися в широкому діапазоні – від ng/ml до сотень µg/ml. Серед лабораторних методів визначення HBsAg найбільш поширеним та високочутливим є ІФА, що використовується як для діагностики захворювання, так і для скринінгу донорської крові з метою попередження передачі гепатиту В.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Виявлення HBsAg в тест-системі Vitrotest® HBsAg ґрунтується на твердофазному «сандвіч» методі ІФА. У лунках планшету засорбовані моноклональні антитіла, специфічні до HBsAg. До лунк додаються зразки сироватки або плазми пацієнта та другі антитіла, кон'юговані з ферментом пероксидазою хрому. Під час інкубації, в разі наявності HBsAg в зразку, на твердій фазі формується імунокомплекс антитіло-HBsAg-антитіло. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Зв'язані імунокомплекси виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 30 min інкубації реакція зупиняється і оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm. Значення ОГ, отримане для зразку, дозволяє виявити наявність або відсутність антигену. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антигену, зв'язаного на твердій фазі.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	2x96 лунк	ІФА-планшет У кожній лунці планшету засорбовані моноклональні антитіла до HBsAg. Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунк.
--------------	-----------	---

CONTROL +	1x1,8 ml	Позитивний контроль Розчин рекомбінантного поверхневого антигену вірусу гепатиту В у буфері з консервантом (рожевий).
CONTROL –	2x1,8 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий)
CONJUGATE DILUENT	1x13 ml	Розчин для розведення кон'югату Буферний розчин з детергентом та консервантом (рожевий).
CONJUGATE 11x	1x1,3 ml	Кон'югат (11x) 11-ти кратний концентрат кон'югату моноклональних антитіл до HBsAg з пероксидазою хрому у буферному розчині зі стабілізаторами (синій).
TMB SOLUTION	1x22 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.
WASH TWEEN 20X	1x80 ml	Розчин для промивання Tw20 (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x22 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

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

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 42 °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** та **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 потраплення 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 розчину кон'югату 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 спектрофотометру).

5.2. Заходи безпеки

- 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;
- позитивний та негативний контролю тест-системи Vitrotest® HBsAg не містять компонентів людського походження;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потрапленні **TMB SOLUTION** **STOP SOLUTION** та розчин кон'югату 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 автоклавувати 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 (літій-гепарин, цитрат натрію, калію фторид) 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) звільнити зразок від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./min протягом 10-15 min. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) з 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 1 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

Ні в якому разі не використовувати для дослідження зразки, що містять розчин азиду натрію.

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

Для попередження конденсації води в лунках слід відкривати **ELISA STRIPS** лише після витримання 30 min за кімнатної температури. Потім розкривати 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 розвести концентрат **WASH TWEEN 20X** 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішати. Наприклад, 4 мл концентрату + 76 мл води, що достатньо для 8 лунок. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину для промивання прогріти флакон за температури 37 °С до повного розчинення кристалів (15 - 20 min). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8 °С не більше 7 днів.

8.3. Приготування розчину кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується безпосередньо перед використанням наступним чином:

Розвести **CONJUGATE 11X** (синій) у чистому флаконі **CONJUGATE DILUENT** (рожевий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у фіолетовий колір. Наприклад, для 16 лунок аналізу додати до 1 мл **CONJUGATE DILUENT** 100 μ л **CONJUGATE 11X**.

Розчин є стабільним протягом 8 h при зберіганні за температури 18-25 °С

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири 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. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.5. Внести в лунки по 100 μ л **контролів** та досліджуваних зразків: в лунку А1 – **CONTROL +**, в лунки В1, С1 та D1 – **CONTROL -**. В решту лунок – досліджувані зразки.

9.6. Поверх контролів та досліджуваних зразків внести в лунки по 50 μ л розчину кон'югату. Для запобігання кросконтамінації зразків кон'югат слід вносити не торкаючись зразків в лунках. Обережно постукуючи по планшету, перемішати суміш в лунках

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 120 min при температурі 42 °С.

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

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки не менш ніж по 300 μ л 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 μ л;
- повторити процедуру промивання ще п'ять разів;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологоти, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.9. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 μ л **TMB SOLUTION** в лунки

9.10. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °С. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.

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

9.12. 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 одноквільвовому 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) та рівень граничного значення (Cut off - CO).

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

$$CO = Nc + 0,07;$$

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

CONTROL +	ОГ \geq 1,500
CONTROL -	ОГ \leq 0,150
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

Якщо одне зі значень ОГ негативного контролю виходить за межі вказаного вище інтервалу, його відкидають і розраховують N_c 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

$OG_{\text{зразка}} > CO$	ПОЗИТИВНИЙ*
$OG_{\text{зразка}} < CO$	НЕГАТИВНИЙ**

* Зразки зі значенням оптичної густини вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи Vitrotest® HBsAg. Після повторного тестування позитивними в тест-системі Vitrotest® HBsAg вважаються зразки, оптична густина котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні оптична густина зразка в обох повторах була нижче граничного значення такий зразок вважати негативним.

** Зразки із значенням оптичної густини нижче граничного значення вважаються негативними в тест-системі Vitrotest® HBsAg. Однак результати в межах 10 % нижче граничного значення слід інтерпретувати з обережністю (рекомендується повторно дослідити такі зразки в двох лунках тест-системи).

Для верифікації специфічності реакції кожен позитивний результат (відповідно до критеріїв інтерпретації тест-системи Vitrotest® HBsAg) необхідно підтвердити в нейтралізаційному ІФА з використанням комплекту реагентів Vitrotest® HBsAg-Confirmation.

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Межу чутливості аналізу щодо виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В в тест-системі Vitrotest® HBsAg визначали з використанням Міжнародного стандарту WHO International Standard Third International Standard for HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2) NIBSC code: 12/226 (NIBSC, Великобританія). Чутливість тесту щодо виявлення HBsAg з використанням даного стандарту становила 0,05 IU/ml.

Для оцінки діагностичних характеристик тест-системи Vitrotest® HBsAg було використано комерційну панель охарактеризованих зразків сироваток крові, що містять та не містять HBsAg «Контроль (+/-) HBsAg- МБА» (ТОВ «Медбіоальянс», Україна). В тест-системі Vitrotest® HBsAg отримано результати, що повністю співпадають з паспортними даними на панель: всі сироватки, що містять поверхневий антиген були визначені як позитивні, а ті, що не містять, визначені як негативні.

Для визначення чутливості тест-системи Vitrotest® HBsAg було протестовано 76 зразків, отриманих від пацієнтів, хворих на гепатит В, що визначені як зразки з «істинним» клінічним станом. При цьому, поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) був виявлений у 76 зразках, а чутливість тест-системи Vitrotest® HBsAg становить 100,0%.

Специфічність тест-системи Vitrotest® HBsAg була протестована на 304 зразках сироваток крові клінічно здорових донорів (серонегативні по відношенню до вірусу гепатиту В), та становить 100,0 %.

11.2. Точність

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

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем HBsAg оцінювали в 32 повторах на одній постановці тест-системи.

№ сироватки	$OG_{\text{сер}}$	CV, %
543	2,936	4,1
304	0,719	6,5

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

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

№ сироватки	$OG_{\text{сер}}$	CV, %
543	2,930	4,0
304	0,704	5,6

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Негативний результат в тест-системі Vitrotest® HBsAg показує, що тестований зразок не містить HBsAg, або його концентрація нижче 0,05 IU/ml. Оскільки зразок може містити HBsAg в дуже низькій концентрації, негативний результат в тест-системі Vitrotest® HBsAg не дає можливості повністю виключити інфікування вірусом гепатиту В.

Окрім того, в літературі описано деякі випадки вірусного гепатиту В (гострого чи хронічного), коли в зразку виявлялась вірусна ДНК за умови відсутності HBsAg. В таких випадках корисним буде дослідження зразка на інші маркери вірусного гепатиту В, виявлення ДНК та оцінка біохімічних показників сироватки крові пацієнта.

Для коректної діагностики гепатиту В рекомендується провести дослідження зразка на наявність специфічних антитіл класу IgM та IgG до HBcore антигену та антитіл до HBsAg (наприклад, у тест-системах Vitrotest® HBcore-IgM, Vitrotest® HBcore-IgG та Vitrotest® Anti-HBs, відповідно).

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів 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

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // Clinical Microbiology Review – 1999 – Vol.12, № 2 - p. 351–366
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // Clin. Lab. - 2001. - V. 47, N 1-2. - P. 51-55.
3. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // Postgrad. Med. J. - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
4. Hsia C.C., Scudamore C.H., Di Bisceglie A.M., Tabor E. Molecular and serological aspects of HBsAg-negative hepatitis B virus infections in North America // J. Med. Virol. - 2003. - V.70, N 1. - P. 20-26.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення <л> кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (Ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

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

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_HBsAg_TK059_V01

Редакція Інструкції № 1 від 02.08.2021 р.

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)

tel.: +38(044)222-76-72, +38(097)222-76-72

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



UA.TR.099

Vitrotest® HBsAg

СХЕМА АНАЛІЗУ



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



Внести по 100 µl контролів та зразків у лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 та інші лунки – досліджувані зразки



Внести по 50 µl розчину кон'югату в лунки



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 120 min при 42 °С.



Промити лунки 6 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в кожену лунку



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °С



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



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

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3$; $CO = Nc + 0,07$;

Nc - середнє значення ОГ з [CONTROL -].
 CO - граничне значення

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$OG_{\text{зразка}} > CO$	ПОЗИТИВНИЙ
$OG_{\text{зразка}} < CO$	НЕГАТИВНИЙ