

ВНИМАНИЕ! ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ С РАСТВОРОМ ТМБ СОКРАТИЛОСЬ ДО 15 МИН!

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Vitrotest® Anti-Ascaris

Иммуноферментная тест-система для выявления антител к
Ascaris lumbricoides

TK051
96 анализов

IVD

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® Anti-Ascaris предназначена для выявления антител класса IgG к *Ascaris lumbricoides* в сыворотке или плазме крови человека. Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аскаридоз распространен во всем мире, особенно в тропических и субтропических странах. Возбудитель аскаридоза у человека - *Ascaris lumbricoides*, - круглый гельминт из группы нематод. Взрослые аскариды паразитируют в тонком кишечнике, имеют длину 15-40 см и диаметр до 5 мм, производят до 200000 яиц в день.

Человек заражается яйцами аскарид через загрязненную воду или пищевые продукты. Зрелые яйца аскарид попадают в двенадцатиперстную кишку, где из них выходят личинки, которые проникают в кровоток. С током крови личинки достигают печени, сердца и легких. В альвеолах легких личинки развиваются и через 3 недели при откашливании с током слизи по дыхательным путям попадают в глотку, вторично заглатываются, и далее попадая в тонкий кишечник, достигают половой зрелости.

Часто, инфекция *A. lumbricoides* проходит бессимптомно. Однако, в случае тяжелой инфекции, симптомы могут включать кровавую мокроту, кашель, лихорадку, дискомфорт в животе, кишечные язвы и выход паразитов. Аскаридоз также является наиболее частой причиной синдрома Леффлера во всем мире. Сопутствующие симптомы включают легочную инфильтрацию и эозинофилию.

Основными методами диагностики аскаридоза является микроскопия (обнаружение яиц в фекалиях) и серологические (обнаружение антител с помощью ИФА).

Наиболее распространенным методом лабораторной диагностики аскаридоза в настоящее время является обнаружение яиц и гельминтов в фекалиях. Этот метод эффективен при паразитировании взрослых аскарид в кишечнике. На стадии миграции личинок эффективность диагностики аскаридоза может быть значительно повышена при применении ИФА для выявления антител к антигенам гельминта. Результаты такого серологического анализа в комплексе с данными анамнеза и учетом клинической симптоматики пациента позволяют диагностировать аскаридозную инвазию на ранних стадиях и начать проведение терапии еще до появления осложнений заболевания.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфичных к *A. lumbricoides*, в тест-системе Vitrotest® Anti-Ascaris базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы антигены *A. lumbricoides*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета специфичные к *A. lumbricoides* антитела, при условии их присутствия, связываются с антигенами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Комплексы антиген-антитело выявляются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 15 мин инкубации реакция останавливается при добавлении стоп-реагента. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 нм. Значение ОП, полученное для образца, позволяет установить наличие или отсутствие антител к *A. lumbricoides*. Интенсивность желтой окраски прямо пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы антигены <i>A.lumbricoides</i> . Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов, специфических к <i>A. Lumbricoides</i> , с консервантом (розовый).

CONTROL –	1x0,5 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зеленый).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Раствор конъюгата Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зелёный), готовый к использованию.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

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

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для *in vitro* диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли тест-системы Vitrotest® Anti-Ascaris не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] и [CONJUGATE SOLUTION] на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат [WASH TWEEN 20X] 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 ml концентрата + 76 ml воды, что достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в

концентрате раствора для промывания, прогреть флакон при 37 °С до полного растворения кристаллов (15-20 min). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 µl [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 10 µl контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 та D1 – [CONTROL –], в остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора в лунках с коричнево-зеленого на синий.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при температуре 37 °С.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 µl раствора для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 µl;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. В лунки внести по 100 µl [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при 37 °С.
- 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.11. Инкубировать стрипы в течение **15 min** в темном месте при комнатной температуре 18-25 °С. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION] придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].
- 9.13. Измерить на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 min после остановки реакции. До проведения измерения необходимо убедиться в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.
Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

$$CO = N_c + 0,3;$$

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

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

[CONTROL +]	ОП $\geq 1,200$
[CONTROL –]	ОП $\leq 0,150$
[CONTROL –]	$N_c \times 0,5 \leq N_{cn} \leq N_c \times 2,0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Для оценки чувствительности было проанализировано 64 образца сывороток крови, положительных в другой коммерческой тест-системе, относительная чувствительность Vitrotest® Anti-Ascaris при этом составляла 92 %. В сравнительных исследованиях тест-системы Vitrotest® Anti-Ascaris с другой коммерческой тест-системой было проанализировано 224 отрицательных образца сывороток крови доноров. При этом относительная специфичность набора составила 93,3 %.

11.2. Точность

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

Коэффициент вариации (CV) для трех сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 24 повторях на одной серии тест-системы.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
102L	0,636	1,83	5,3
133L	1,349	3,88	1,0
948	2,593	7,45	1,0

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
102L	0,637	1,76	3,7
133L	1,329	3,67	2,5
948	2,539	7,01	2,5

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе Vitrotest® Anti-Ascaris является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфичных к *Ascaris lumbricoides*. Наличие антител этого класса у новорожденных не является доказательством инвазии *Ascaris lumbricoides*.

Неопределенные результаты могут свидетельствовать об инвазии *Ascaris lumbricoides* в анамнезе.

Отрицательный результат в тест-системе Vitrotest® Anti-Ascaris свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце антител, специфичных к *Ascaris lumbricoides*, или концентрация специфических антител ниже предела чувствительности анализа.

Окончательный диагноз не может быть установлен только на основании результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать результаты комплекса лабораторных и инструментальных исследований, а также клинические проявления заболевания. Нельзя полностью исключить перекрестные реакции с антителами к антигенам других гельминтов.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

REF

Номер по каталогу



Используйте инструкцию по применению

IVD

Медицинское изделие для диагностики in vitro



Производитель



Предупреждение



Достаточно для проведения <n> количества исследований



Ограничение температуры

LOT

Код партии



Использовать до



Дата производства



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011
Inst_Anti-Ascaris_TK051_V07_RU

Редакция Инструкции № 7 от 12.01.2022

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Київ, 04075, Украина (местонахождение производства)

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



ВНИМАНИЕ! ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ С РАСТВОРОМ ТМБ СОКРАТИЛОСЬ ДО 15 МИН!

Vitrotest® Anti-Ascaris

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты не менее 30 мин при 18-25 °С перед использованием



Внести 90µl **[SAMPLE DILUENT]** в лунки
(коричнево-зеленый цвет)



Внести 10µl контролей и образцов в лунки:

A1 – **[CONTROL +]**,

B1, C1, D1 – **[CONTROL -]**,

E1 и другие лунки – исследуемые образцы

(цвет изменится с коричнево-зеленого на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 мин при 37 °С



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



Добавить 100µl **[CONJUGATE SOLUTION]** в лунки
(зеленый цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 мин при 37 °С



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



Добавить 100µl **[TMB SOLUTION]** в каждую лунку



Инкубировать **15 min** в темноте при 18-25 °С



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



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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

$$CO = Nc + 0,3;$$

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

Nc - OD_{mean} для 3 **[CONTROL -]**

CO - Cut off, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Vitrotest® Anti-Lambliia

Иммуноферментная тест-система для выявления антител к *Giardia lamblia (intestinalis)*

TKO30
96 анализов

IVD

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система Vitrotest Anti-Lambliia предназначена для выявления суммарных антител к *Giardia lamblia (intestinalis)* в сыворотке или плазме крови человека. Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Giardia Lamblia (intestinalis) вызывает лямблиоз (гиардиаз) - паразитарную инвазию, которая протекает в виде латентного паразитоза с манифестных форм (нарушение функций кишечника). Заболевания лямблиозом зафиксировано на всех 5 континентах и в большинстве стран мира. Уровни инфицирования варьируют от <1 до 50 %. Во многих развивающихся странах, с отсутствующими базовыми санитарными условиями, инфицирование *Giardia* в возрасте 2 лет является почти стопроцентным. В противоположность этому, в развитых странах инфицированность лямблией составляет лишь 3-7 %. Заболевания распространены среди всех возрастных групп, однако основной контингент составляют дети дошкольного возраста.

Основной путь передачи *G. lamblia* - фекально-оральный. Паразит имеет простой, двухстадийный жизненный цикл. После проглатывания хозяином цист, из последних в двенадцатиперстной кишке появляются трофозоиты, которые прикрепляются к слизистой оболочке тонкого кишечника.

Трофозоиты существуют только на поверхности слизистой оболочки верхнего отдела тонкой кишки. Поэтому лямблии механически блокируют слизистую оболочку и нарушают пристеночное пищеварение и двигательную активность тонкой кишки. Лямблии вызывают ухудшение всасывания жиров, углеводов, витаминов С и В12 и обуславливают вторичную бактериальную инфекцию. Симптомами лямблиоза могут быть: диарея, усталость, отек, апатия, потеря массы тела, снижение аппетита, бледность, мышечные подергивания. Со стороны желудочно-кишечного тракта лямблиоз проявляется главным образом в виде энтероколита с катаральными проявлениями.

Многочисленные факты свидетельствуют о роли гуморального иммунного ответа в элиминации *G.lamblia*. Как было показано на модели с экспериментальным инфицированием людей, уровень антител класса IgM значительно возрастал на 14-21 день после инфицирования и постепенно снижался после терапии. В противоположность этому, уровни антител класса IgG оставались повышенными после успешного лечения. Динамика уровня IgA была подобна таковой IgM.

Диагностика лямблиоза традиционно базируется на клинической истории, симптомах, наличии цист в фекальных пробах или трофозоитов в материале, полученном из тонкого кишечника при дуоденальной аспирации или дуоденальной биопсии. Альтернативными методами является выявление антигена *G.lamblia* в фекалиях и определения уровня специфических антител против *Giardia* в сыворотке пациента. Серологическое тестирование рассматривается как полезное дополнение в диагностике гиардиаза. Кроме помощи в постановке диагноза, оно может быть полезным для оценки состояния иммунного ответа пациента, а также для эпидемиологических исследований.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление специфичных к *G. lamblia* суммарных антител в тест-системе Vitrotest Anti-Lambliia базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА при двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы очищенные антигены *G. lamblia*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета происходит связывание, при условии присутствия в образцах, специфичных к *G. lamblia* антител с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных компонентов, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется смесь антивидовых конъюгатов (анти-IgG, анти-IgM и анти-IgA) моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Комплексы антиген-антитело выявляются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30 min инкубации реакция останавливается при добавлении стоп-реагента. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Значение ОП, полученное для образца, позволяет установить наличие или отсутствие антител к *G. Lamblia*. Интенсивность желтой окраски прямо пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы очищенные антигены <i>G. lamblia</i> . Лунки можно отделять, 12 стрипов по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов, специфических к <i>G. lamblia</i> , с консервантом (розовый).
CONTROL -	1x0,5 ml	Отрицательный контроль Отрицательная сыворотка крови человека с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Раствор конъюгата Буферный раствор пероксидазного конъюгата моноклональных антител к IgG, IgM и IgA человека, со стабилизаторами и консервантом (зеленый), готовый к использованию.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION**

с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно вымытую дистиллированной водой посуду;

- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для **CONJUGATE SOLUTION** и **TMB SOLUTION**.

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

5.2. Меры безопасности

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

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

Для предупреждения конденсации воды в лунках необходимо открывать **ELISA STRIPS** только после выдерживания 30 min при комнатной температуре. Потом раскрыть вакуумную

упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и *хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock)* при температуре 2-8 °С. Хранение таким образом упакованного планшета обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
 - 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
 - 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункта 8.2.
 - 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 µl [SAMPLE DILUENT].
 - 9.5. Внести в лунки по 10 µl контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 та D1 – [CONTROL –], в остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора в лунках с фиолетового на синий.
 - 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при температуре 37 °С.
 - 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 µl раствора для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 µl;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
 - 9.8. В лунки внести по 100 µl [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при 37 °С.
 - 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
 - 9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки.
 - 9.11. Инкубировать стрипы в течение 30 min в темном месте при комнатной температуре 18-25 °С. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
 - 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION] придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].
 - 9.13. Измерить на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 min после остановки реакции. До проведения измерения необходимо убедиться в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.
- Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).*

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

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

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

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

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	ОП $\geq 1,200$
CONTROL -	ОП $\leq 0,150$
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Для оценки чувствительности было проанализировано 44 образца сывороток крови, положительных в другой коммерческой тест-системе. Относительная чувствительность Vitrotest® Anti-Lambliа при этом составляла 94 %. В сравнительных исследованиях тест-системы Vitrotest® Anti-Lambliа с другой коммерческой тест-системой было проанализировано 231 отрицательный образец сывороток крови доноров. При этом относительная специфичность набора составила 97,5 %.

11.2. Точность

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

Коэффициент вариации (CV) для трех сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 24 повторях на одной серии тест-системы.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
38S	0,690	2,29	3,0
37S	1,646	5,47	5,8
17S	2,590	8,49	3,3

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
38S	0,672	2,28	4,2
37S	1,615	5,47	5,6
17S	2,523	8,56	7,3

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Окончательный диагноз не может быть установлен только на основании результатов серологического теста, следует учитывать клинические проявления заболевания и данные лабораторных исследований (например, результаты выявления цист в фекальных пробах или трофозоитов в дуоденальном содержимом, результаты выявления антигена *G.lambliа* в фекалиях).

Нельзя полностью исключить перекрестные реакции с антителами к антигенам других паразитов.

Специфичные к *Giardia lambliа* антитела могут не проявляться у детей с устойчивым и длительным лямблиозом.

Следует заметить, что антитела класса IgG к *G. lambliа* могут длительное время проявляться в ИФА, даже после успешно проведенного лечения.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу
	Используйте инструкцию по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Производитель
	Предупреждение
	Достаточно для проведения <n> количества исследований
	Ограничение температуры
	Код партии
	Использовать до
	Дата производства
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011
Inst_Anti-Lambliа_TK030_V05_RU
Редакция Инструкции №5 от 08.09.2021

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Київ, 04075, Украина (местонахождение производства)

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



Vitrotest® Anti-Lambliа

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты не менее 30 min при 18-25 °С перед использованием



Внести 90µl [SAMPLE DILUENT] в лунки
(фиолетовый цвет)



Внести 10 µl контролей и образцов в лунки:
A1 – [CONTROL +],
B1, C1, D1 – [CONTROL -],
E1 и другие лунки – исследуемые образцы
(цвет изменится с фиолетового на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 min при 37 °С



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



Добавить 100 µl [CONJUGATE SOLUTION] в лунки
(зеленый цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 min при 37 °С



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



Добавить 100 µl [TMB SOLUTION] в каждую лунку



Инкубировать 30 min в темноте при 18-25 °С



Остановить реакцию внесением 100 µl [STOP SOLUTION]
(цвет меняется с синего на жёлтый)



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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

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

Nc - OD_{mean} для 3 [CONTROL -]

CO - Cut off, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Vitrotest® Anti-Toxocara

Иммуноферментная тест-система для выявления антител к *Toxocara canis*

TK058
96 анализов



1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® Anti-Toxocara предназначена для выявления антител класса IgG к *Toxocara canis* в сыворотке или плазме крови человека. Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Токсокароз - зоонозное заболевание, обусловленное паразитированием в организме человека личинок круглых червей рода *Toxocara*, часто протекающее с поражением внутренних органов и глаз. Заболевание широко распространено во всех странах мира, к тому же, чаще всего поражаются дети. Известны несколько видов этого рода, в патологии человека наибольшее изучена роль *Toxocara canis* (гельминт, что поражает, преимущественно, семейство собачьих), меньше - *Toxocara cati* (поражает, преимущественно, представителей семейства кошачьих).

Источником инвазии для человека, главным образом, являются собаки, загрязняющие почву яйцами токсокар, выделяя их вместе с фекалиями. Инфицированность собак этим гельминтом составляет примерно 15-50 %, но в некоторых регионах достигает 90%. Больные люди не являются источником инвазии, так как в их организме цикл развития токсокар неполный (половозрелые формы не образуются).

Люди заражаются токсокарозом при проглатывании яиц токсокар с пищей или водой, загрязненными выделениями животных, а также при контакте с зараженными животными. Личинки, выходящие из яиц, мигрируют сквозь стенки кишечника в кровеносное русло и попадают в различные органы и ткани, где инкапсулируются и, сохраняя длительное время биологическую активность, вызывают личиночную форму заболевания. Мигрируя в организме человека, личинки травмируют ткани, оставляя некрозы и воспалительные процессы.

Клинические проявления токсокароза зависят от локализации паразитов и интенсивности инвазии. В клиническом течении выделяют две формы инвазии: висцеральный синдром «мигрирующей личинки» (visceral larva migrans) и токсокароз глаз (ocular larva migrans). Висцеральный токсокароз часто проявляется лихорадкой с рецидивами в течение нескольких недель, даже месяцев. Отмечается увеличение отдельных лимфатических узлов, наблюдается поражение органов дыхательной системы (бронхиты и бронхопневмонии). Практически для всех случаев характерна эозинофилия.

Прижизненный паразитологический диагноз токсокароза является практически невозможным, поскольку обнаружить мигрирующие личинки в организме трудно. Гистологические исследования биоптатов лишь в ряде случаев позволяют выявить личинки токсокар и установить паразитологический диагноз. В то же время многочисленные исследования показали, что серологические исследования с использованием очищенных антигенов личинок, в частности иммуноферментный анализ, являются достаточно чувствительным и специфичным методом диагностики. На сегодняшний день этим методом обнаруживают антитела, специфичные к экскреторно-секреторным и соматическим антигенам личинок *Toxocara canis*.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфичных к *Toxocara canis* в тест-системе Vitrotest® Anti-Toxocara базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА при двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы антигены личинки *T. canis*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета происходит связывание, при условии присутствия в образцах, специфичных к *T. canis* антител с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязавшихся антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело.

После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, который связывается с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время промывки. Комплексы антиген-антитело выявляются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30 min инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Значение ОП, полученное для образца, позволяет выявить наличие или отсутствие антител к *T. canis*. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы антигены личинок <i>T. canis</i> . Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов, специфических к <i>T. canis</i> , с консервантом (розовый).
CONTROL -	1x0,5 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зеленый).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Раствор конъюгата Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зелёный), готовый к использованию.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;

- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно вымытую дистиллированной водой посуду;
- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для **CONJUGATE SOLUTION** и **TMB SOLUTION**.

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

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и **CONJUGATE SOLUTION** на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.

9.2. Заполнить бланк внесения проб.

9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункта 8.2.

9.4. Внести во все лунки планшета по 90 μ l **[SAMPLE DILUENT]**

9.5. Внести в лунки по 10 μ l контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – **[CONTROL +]**, в лунки B1, C1 та D1 – **[CONTROL -]**, в остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора в лунках с коричнево-зеленого на синий.

9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при температуре 37 °C.

9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

- удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
- наполнить лунки не менее чем по 300 μ l раствора для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
- аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 μ l;
- повторить процедуру промывания еще четыре раза;
- после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

9.8. В лунки внести по 100 μ l **[CONJUGATE SOLUTION]**. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при 37 °C.

9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.

9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 μ l **[TMB SOLUTION]** в лунки.

9.11. Инкубировать стрипы в течение 30 min в темном месте при комнатной температуре 18-25 °C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.

9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 μ l **[STOP SOLUTION]** придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **[TMB SOLUTION]**.

9.13. Измерить на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 min после остановки реакции. До проведения измерения необходимо убедиться в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

$$N_c = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,3; \quad IP_{sample} = OD_{sample} / CO; \quad \text{где } OD_{sample} - \text{ОП}_{образца}$$

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	$OD \geq 1,200$
CONTROL -	$OD \leq 0,150$
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Для оценки чувствительности было проанализировано 97 образцов сывороток крови, положительных в двух других коммерческих тест-системах, относительная чувствительность Vitrotest® Anti-Toxocara при этом составляла 98 %. Кроме того, в сравнительных исследованиях тест-системы Vitrotest® Anti-Toxocara с другой коммерческой тест-системой было проанализировано 285 отрицательных образцов сывороток крови. При этом относительная специфичность набора составила 97,9 %.

11.2. Точность

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

Коэффициент вариации (CV) для 3 сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 24 повторях на одной серии тест-системы.

№ сыворотки	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
21L	0,449	1,36	2,2
31L	1,223	3,71	5,9
58L	0,605	1,83	4,7

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для 3 сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа, по 8 повторам в каждом анализе.

№ сыворотки	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
76L	1,118	3,26	4,42
78L	1,540	4,49	3,70
79L	0,484	1,41	5,43

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе Vitrotest® Anti-Toxocara является свидетельством наличия у пациента антител класса IgG, специфичных к *Toxocara canis*. Наличие антител этого класса у новорожденных не является доказательством инвазии *Toxocara canis*.

Неопределенные результаты могут свидетельствовать о инвазии *Toxocara canis* в анамнезе.

Отрицательный результат в тест-системе Vitrotest® Anti-Toxocara свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце антител, специфичных к *Toxocara canis*, или концентрация специфических антител ниже предела чувствительности анализа.

Окончательный диагноз не может быть установлен только на основании результатов серологического теста. При установлении диагноза следует учитывать результаты комплекса лабораторных и инструментальных исследований, а также клинические проявления заболевания. Нельзя полностью исключить перекрестные реакции с антителами к антигенам других гельминтов.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. 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., Dorchie Ph., Morassin B. Highlights of human toxocarosis. // 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.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

REF

Номер по каталогу



Используйте инструкцию по применению

IVD

Медицинское изделие для диагностики in vitro



Производитель



Предупреждение



Достаточно для проведения <n> количества исследований



Ограничение температуры

LOT

Код партии



Использовать до



Дата производства



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011
Inst_Anti-Тохосара_TK058_V04_RU

Редакция Инструкции № 4 от 28.08.2021

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Київ, 04075, Украина (местонахождение производства)

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



Vitrotest® Anti-Toxocara

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты не менее 30 min при 18-25 °С перед использованием



Внести 90 µl [SAMPLE DILUENT] в лунки
(коричнево-зеленый цвет)



Внести 10 µl контролей и образцов в лунки:
A1 – [CONTROL +],
B1, C1, D1 – [CONTROL -],
E1 и другие лунки – исследуемые образцы
(цвет изменится с коричнево-зеленого на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 min при 37 °С



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



Добавить 100 µl [CONJUGATE SOLUTION] в лунки
(зеленый цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 min при 37 °С



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



Добавить 100 µl [TMB SOLUTION] в каждую лунку



Инкубировать 30 min в темноте при 18-25 °С



Остановить реакцию внесением 100 µl [STOP SOLUTION]
(цвет меняется с синего на жёлтый)



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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

$$CO = N_c + 0,3;$$

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

N_c - OD_{mean} для 3 [CONTROL -]

CO - Cut off, IP - индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

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

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

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

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

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

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

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

5.2. Техника безопасности

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

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

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

8.3. Предварительное разведение образцов, калибраторов и положительного контроля

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

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

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

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

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

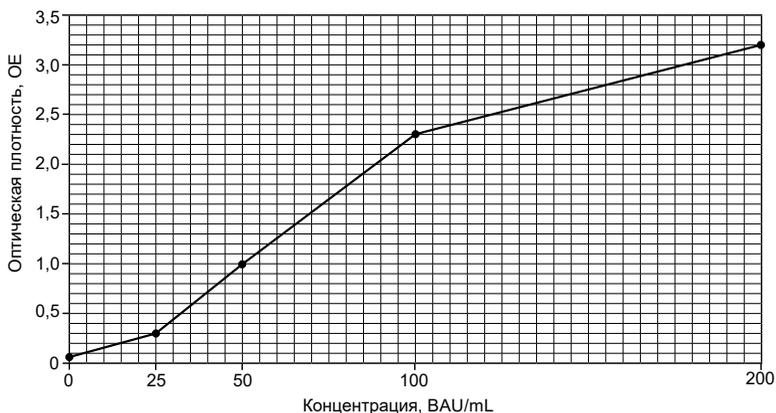
10.1. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

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

10.2. Учет результатов анализа

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



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

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

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

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

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

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

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

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

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

11.2. Точность

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

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

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

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

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

11.3. Аналитическая чувствительность

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

11.4. Диапазон линейности

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

11.5 Соответствие калибраторов тест-системы Международному стандарту

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

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

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

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

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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

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

Inst_SARS-CoV-2-IgG_QuantiSpike_TK040_V02

Редакция 2 от 29.03.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



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



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



Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike™

СХЕМА АНАЛИЗА



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



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



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

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

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



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



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



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



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



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



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



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



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



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

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

Провести учёт результатов анализа соответственно таблице:

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

Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG

ELISA test-kit for the qualitative and semiquantitative determination of IgG antibodies to SARS-CoV-2

TK039

96 tests

1. INTENDED USE

The test-kit «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semiquantitative determination of IgG antibodies to SARS-CoV-2 coronavirus 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

COVID-19 is an infectious disease caused by a new SARS-CoV-2 coronavirus which had not previously been detected in humans.

The viral infection leads to the development of a respiratory flu-like disease with symptoms such as cough and fever. In more severe cases pneumonia can develop. The average incubation period of the COVID-19 is 6,5 days, but it can range from 3 to 21 days.

Coronavirus SARS-CoV-2 is an RNA-containing virus with a characteristic envelope with spikes in the form of a "corona". The main structural proteins of the virus include the nucleocapsid protein and transmembrane S (spike) protein with a receptor-binding domain (RBD), which binds to human cell receptors ACE2, causing infection of the mucosal epithelial cells. Both proteins are highly immunogenic antigens for humans.

Specific antibodies (IgM, IgG, IgA) against the virus appear 7-11th days from the moment of infection and/or contact of the body with the virus. Anti-SARS-CoV-2 IgM antibodies can be detected beginning from day 4 of the first symptoms of the disease. Specific antibodies are detected in less than 40% of patients with COVID-19 during the first week of the onset of symptoms. The levels of these antibodies increase rapidly and are detected in almost all patients by the end of the second week of clinical manifestations. On the 20th day, from the onset of the symptoms of the COVID-19, specific IgG are detected in almost 100% of patients (except for individuals with immunosuppression).

According to some scientific data, there is a clear correlation between the severity of the disease and the level of specific IgG in the blood in the second week of clinical manifestations.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Determination of IgG antibodies specific to SARS-CoV-2 in the test-kit «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» is based on a solid phase, indirect ELISA in a two-step incubation procedure. Microwells are coated with the nucleocapsid recombinant antigens of SARS-CoV-2. During the first incubation step, the specific antibodies to SARS-CoV-2, if present in the sample, are bound to the solid phase precoated antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies. A secondary antibodies (anti-IgG), which are conjugated to horseradish peroxidase (HRP), are added next and bind to the immune complexes on the solid phase. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are revealed by addition of chromogen solution containing 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide. After 30 minutes the reaction has been stopped, the absorbance values are read using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The colour intensity is proportional to the amount of the specific 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 the recombinant antigens SARS-CoV-2. The wells can be separated.
PREDILUTION PLATE	1x96 wells	Microplate for preliminary dilution of sera
CONTROL +	1x0.3 ml	Positive control Solution of conjugated specific antibodies with preservative (pink).
CONTROL -	1x0.5 ml	Negative control Albumin solution with preservative (yellow).
SAMPLE PREDILUENT	1x20 ml	Sample prediluent Buffer solution with detergent and preservative (brown-green).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (yellow).

CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Conjugate solution (ready to use) Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG conjugated to HRP with stabilizers and preservative (violet).
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**, **SAMPLE PREDILUENT** 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;
- protective clothes, 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 and negative controls do not contain components of human origin;
- 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.

8.3. Predilution of samples and controls

Predilute patient samples and controls 1:10 with SAMPLE PREDILUENT immediately before test. Dispense 90 µl of SAMPLE PREDILUENT in the wells of PREDILUTION PLATE, add 10 µl of samples and controls. Gently mix the content in the wells. After addition of the sample colour of the sample prediluent changes from brown-green to blue.

After dilution and transfer of the samples, the used PREDILUTION PLATE wells must be disinfected by soaking in a disinfectant solution or by autoclaving.

The procedure for dilution of samples and controls should be carried out immediately before analysis.

9. ASSAY PROCEDURE

1. Prepare the necessary number (the number of specimens and controls) of the wells ELISA STRIPS (see 8.1). Place the wells into the frame. Wells with the controls must be included in every test.
2. Complete the sera identification plan.
3. Prepare washing solution (see 8.2).
4. Predilute patient samples and controls (see 8.3).
5. Dispense 90 µl of SAMPLE DILUENT into each well.
6. Add 10 µl of prediluted controls and patient samples to the wells in the following order: A1 – CONTROL|+, B1, C1 and D1 – CONTROL|-, other wells – patient samples. The final dilution in the wells is 1:100. Pipette gently to avoid foaming. The colour of the sample diluent changes from yellow to green.
7. Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.
8. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 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 5µl;
 - 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.

- 9.9. Dispense 100 µl of [CONJUGATE SOLUTION] per well. Cover strips with a new adhesive film, incubate for 30 min at 37°C.
- 9.10. Remove and discard the adhesive film and wash all wells five times as described above (see 9.8).
- 9.11. Dispense 100 µl [TMB SOLUTION] into all wells. Do not touch the walls and bottoms of the wells to avoid contamination.
- 9.12. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark. Do not use adhesive film in this step.
- 9.13. Add 100 µl [STOP SOLUTION] to each well in the same order and at the same rate as for [TMB SOLUTION].
- 9.14. 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}),

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

10.2. Validation of the test

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

[CONTROL +]	OD ≥ 1.200
[CONTROL -]	OD ≤ 0.150
[CONTROL -]	$Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$

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

10.3. Interpretation of results

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

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

Using IP_{sample} allows performing semiquantitative comparative analysis of the level of specific antibodies in dynamics in paired sera obtained from patients with an interval of 2-4 weeks.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

The specificity of the test-kit «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» was evaluated using 304 samples of human serum obtained during 1-6 months in 2019 (before the COVID-19 pandemic). IgG to SARS-CoV-2 was not detected in all tested samples, the specificity was 100%.

For sensitivity determinations 27 serum samples of patients who have recovered from COVID-19 infection were evaluated. IgG antibodies to SARS-CoV-2 were detected in all tested sera in the «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» test-kit.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 2 samples with various specific antibody levels in 32-replicate determinations using 1 lot of the test-kit.

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
27	0.966	2.99	5.4
30	2.684	8.31	4.6

Inter assay reproducibility

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 2 samples with various specific antibody levels in 4 ELISA performances during 4 days, in 8-replicate determinations.

Serum No.	OD _{mean}	IP _{mean}	CV, %
27	0.937	2.89	5.4
30	2.642	8.14	4.0

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

If the test sample was obtained in the first days after infection IgG antibodies may not be detected. Therefore, a negative result of the test for IgG antibodies to SARS-CoV-2 does not exclude the infection of the patient with the virus. In the presence of clinical manifestations of the disease it is recommended to repeat the test at least in two weeks.

Negative test results in immunosuppressed individuals should also be interpreted with caution.

The final diagnosis cannot be established solely on the basis of serological test results. The diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology, as well as the results of other laboratory tests (including PCR).

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 ≥ 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

Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к коронавирусу SARS-CoV-2

TK039

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Коронавирусная инфекция COVID-19 – инфекционное заболевание, которое вызывается новым коронавирусом SARS-CoV-2, который ранее у людей не выявлялся.

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

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

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

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

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунки	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены SARS-CoV-2. Лунки можно отделять.
PREDILUTION PLATE	1x96 wells	Планшет для предварительного разведения сывороток
CONTROL +	1x0,3 мл	Положительный контроль Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый)
CONTROL -	1x0,5 мл	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).

SAMPLE PREDILUENT	1x20 ml	Раствор для предварительного разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зеленый).
SAMPLE DILUENT	1x 12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый).
CONJUGATE SOLUTION	1x 12 мл	Раствор конъюгата (готов к использованию) Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый).
TMB SOLUTION	1x 12 мл	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный).
WASH TWEEN 20X	1x 50 мл	Раствор для промывания Tw20 (20x концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x 12 мл	Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 M H ₂ SO ₄ (бесцветный).

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

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

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;

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

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

8.3. Предварительное разведение образцов и контролей

Исследуемые образцы и контроли предварительно разведите в 10 раз **SAMPLE PREDILUENT**. Для этого в необходимое количество лунок **PREDILUTION PLATE** (комплектуются в наборе) внесите по 90 мкл **SAMPLE PREDILUENT** и добавьте по 10 мкл образцов и контролей. При внесении образцов и контролей осторожно пипетируйте смесь, при этом цвет раствора для предварительного разведения сывороток должен измениться с коричнево-зеленого на синий.

После разведения и переноса образцов использованные лунки **PREDILUTION PLATE** необходимо обеззаразить путем замачивания в дезинфицирующем растворе или автоклавированием. Процедуру разведения образцов и контролей следует проводить непосредственно перед анализом.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок (ELISA STRIPS) для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
 - 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
 - 9.3. Приготовить раствор для промывывания согласно пункту 8.2.
 - 9.4. Провести предварительное разведение образцов и контролей в соответствии с пунктом 8.3.
 - 9.5. Внести во все лунки планшета по 90 мкл (SAMPLE DILUENT).
 - 9.6. Внести в лунки по 10 мкл предварительно разведенных контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – (CONTROL +), в лунки B1, C1 и D1 – (CONTROL -). В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с желтого на зеленый.
 - 9.7. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
 - 9.8. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
 - 9.9. В лунки внести по 100 мкл (CONJUGATE SOLUTION). Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
 - 9.10. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.8.
 - 9.11. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл (TMB SOLUTION) в лунки.
 - 9.12. Инкубировать стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
 - 9.13. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл (STOP SOLUTION), придерживаясь той же последовательности, что и при внесении (TMB SOLUTION).
 - 9.14. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратите внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.
- Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только (TMB SOLUTION) и (STOP SOLUTION)).*

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

$$N_c = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = N_c + 0.3; \quad IP_{sample} = OD_{sample} / CO; \quad \text{где } OD_{sample} - \text{ОП}_{образца}$$

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

(CONTROL +)	$OD \geq 1.200$
(CONTROL -)	$OD \leq 0.150$
(CONTROL -)	$N_c \times 0.5 \leq N_{cn} \leq N_c \times 2.0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных сыворотках крови, полученных с интервалом в 2-4 недели.

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность тест-системы «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» оценивали на 304 образцах сывороток крови людей, которые были получены в течение 1-6 месяцев 2019 года (до начала пандемии COVID-19). Во всех исследуемых образцах IgG к SARS-CoV-2 не выявлено, специфичность составила 100%.

При определении чувствительности на 27 образцах сывороток крови реконвалесцентов COVID-19, у всех были обнаружены антитела класса IgG к SARS-CoV-2 в тест-системе «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG».

11.2. Точность

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

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

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
27	0.966	2.99	5.4
30	2.684	8.31	4.6

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
27	0.937	2.89	5.4
30	2.642	8.14	4.0

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

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

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

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

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

<i>Возможные причины</i>	<i>Способы устранения проблем</i>
<i>Высокий фон в лунках всего планшета</i>	
Загрязненный промыватель	Прочистить головку промывателя и промыть 30% раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой
Низкое качество или загрязненность воды	Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением ≥ 10 МΩ·см.
Использование плохо вымытой посуды	Использовать химически чистую посуду
Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор	Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства
Использование загрязненных наконечников	Использовать новые наконечники
Увеличено время инкубации или изменен температурный режим	Придерживаться режима инкубации согласно инструкции по применению

Высокий фон в отдельных рядах

Повторное внесение раствора ТМБ	Раствор ТМБ вносить один раз
Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата	Прочистить пипетку и осторожно набирать раствор
Загрязнен один из каналов промывателя	Прочистить канал промывателя, промыть вошер

Значение ОП положительного контроля ниже установленной границы

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

Интенсивность окрашивания лунок не отвечает полученной ОП

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

ЛИТЕРАТУРА

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



Catalogue number / Номер по каталогу



Temperature limitation / Температурный диапазон



Consult instructions for use / Обратитесь к инструкции по применению



Batch code / Код партии



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



Use by / Использовать до



Manufacturer / Производитель



Date of manufacture /Дата изготовления



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



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



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



Authorized representative in the European Community / Уполномоченный представитель в ЕС



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

Inst_SARS-CoV-2_IgG_TK039_V02

Edition 2nd, 14.05.2020.

Редакция 2 от 14.05.2020г.

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

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



Vitrotest Bioreagent LLC, 18B Boychuka street, 56, Kiev, 01103, Ukraine
ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103, Украина

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

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



Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG

ASSAY PROCEDURE



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



Dispense 90 µl of **[SAMPLE PREDILUENT]** (*brown-green colour*) into the wells of **[PREDILUTION PLATE]** and add 10 µl of controls and the samples (*colour changes from brown-green to blue*)



Dispense 90µl of **[SAMPLE DILUENT]** (*yellow colour*) into the wells of **[ELISA STRIPS]** and 10µl prediluted samples and controls:

A1 – **[CONTROL +]**,

B1, C1, D1 – **[CONTROL -]**,

E1 and other wells – patient samples

(*colour changes from yellow to green*)



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



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



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



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



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



Add 100µl of **[TMB SOLUTION]** into the wells



Cover wells with an adhesive film, incubate for 30 min in the dark at 18-25°C



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



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

CALCULATION

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

$$CO = Nc + 0.3;$$

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

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

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® SARS-CoV-2 IgM

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

TK034
96 анализов

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM предназначена для качественного определения антител класса IgM к нуклеокапсидному антигену коронавируса SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме (EDTA, литий-гепарин, цитрат натрия) крови человека.

Иммуноферментная тест-система Vitrotest SARS-CoV-2 IgM определяет также IgM антитела, специфические к Spike-белку коронавируса SARS-CoV-2, в образцах сыворотки и плазмы крови человека методом иммуноферментного анализа.

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

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

В организме инфицированного человека специфические антитела (IgM, IgG, IgA) против N- и S-белка SARS-CoV-2 определяются на 7-11-й день от момента попадания / контакта организма с вирусом. Anti-SARS-CoV-2 IgM и IgA антитела могут быть определены начиная с 4 дня от первых симптомов болезни. N- и S- специфические IgM у пациентов, не требующих интенсивной терапии, могут достигать пика на второй неделе, после появления симптомов COVID-19. По литературным данным, одновременное определение N- и S- специфических антител класса IgM позволяет идентифицировать до 75 % пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, уже на первой неделе клинических проявлений.

В то же время уровень специфических IgG продолжает расти и на 20 день от появления симптомов COVID-19 определяется практически у 100 % пациентов (кроме лиц с иммуносупрессией).

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**4.1. Состав набора**

	<p>1x96 лунок</p>	<p>ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса IgM человека. Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.</p>
--	-----------------------	---

CONTROL +	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор конъюгированных специфических моноклональных антител с консервантом (розовый).
CONTROL -	1x0,5 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x 12 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE SOLUTION	1x 12 ml	Раствор конъюгата Буферный раствор рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый), готовый к использованию.
TMB SOLUTION	1x 12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x 50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твин-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x 12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

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

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

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

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

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

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

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

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для *in vitro* диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] и [CONJUGATE SOLUTION] на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

8.1. Подготовка ИФА-планшета

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

8.2. Приготовление раствора для промывания

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

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок **ELISA STRIPS** для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 μ l **SAMPLE DILUENT**.
- 9.5. Внести в лунки по 10 μ l контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – **CONTROL +**, в лунки B1, C1 и D1 – **CONTROL -**. В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с фиолетового на синий.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при температуре 37 °С.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 μ l раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 μ l;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. В лунки внести по 100 μ l **CONJUGATE SOLUTION**. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при 37 °С.
- 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 μ l **TMB SOLUTION** в лунки.
- 9.11. Инкубировать стрипы в течение 30 min в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 μ l **STOP SOLUTION**, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **TMB SOLUTION**.
- 9.13. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 min после остановки реакции. Обратит внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

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

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,2; \quad IP_{sample} = OD_{sample} / CO; \quad \text{где } OD_{sample} - \text{ОП}_{образца}$$

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	$OD \geq 1,200$
CONTROL -	$OD \leq 0,150$
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

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

10.3. Интерпретация результатов

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

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

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Для оценки диагностических характеристик тест-системы Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM было использовано верификационную панель «Anti-SARS-CoV-2 Verification Panel for Serology Assays» (производства NIBSC, Великобритания), которая содержит 23 образца плазмы крови реконвалесцентов COVID-19 и 14 отрицательных образцов плазмы крови. В тест-системе Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM получены результаты, которые полностью совпадают с паспортными данными на панель.

При сравнительных исследованиях чувствительности тест-системы Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM на 85 образцах, которые определены как положительные в коммерческом аналоге, рекомендованном FDA, процент совпадения полученных результатов составил 96,5 %.

Для определения чувствительности тест-системы Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM на ранних сроках инфицирования SARS-CoV-2 было протестировано 1117 сывороток крови пациентов, полученных на 5-15 день от начала клинических проявлений COVID-19. Специфические антитела класса IgM при этом были обнаружены в 972 образцах.

Специфичность тест-системы Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM на 706 образцах сывороток крови людей, которые были получены в течение первого полугодия 2019 (до начала пандемии COVID-19) составила 99,4 %.

11.2. Точность

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

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

№ сыворотки	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
336	0,755	3,45	2,7
345	2,408	11,02	1,6

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

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

№ сыворотки	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
336	0,758	3,46	2,4
345	2,409	10,99	1,2

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

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

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

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

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу
	Используйте инструкцию по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Производитель
	Предупреждение
	Достаточно для проведения $\langle n \rangle$ количества исследований
	Ограничение температуры
	Код партии
	Использовать до
	Дата производства
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

Inst_SARS-CoV-2_IgM_TK034_V10
Редакция Инструкции № 10 от 19.07.2021

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Київ, 04075, Украина (местонахождение производства)

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



Vitrotest® SARS-CoV-2 IgM

СХЕМА АНАЛИЗА



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



Внести 90µl **[SAMPLE DILUENT]** в лунки стрипов **[ELISA STRIPS]**.
(фиолетовый цвет)



Внести 10µl контролей и образцов в лунки:
A1 – **[CONTROL +]**,
B1, C1, D1 – **[CONTROL -]**,
E1 и другие лунки – исследуемые образцы
(цвет изменится с фиолетового на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 min при 37 °C



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



Добавить 100µl **[CONJUGATE SOLUTION]** в каждую лунку
(зеленый цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 min при 37 °C



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



Добавить 100µl **[TMB SOLUTION]** в каждую лунку



Инкубировать 30 min при 18-25 °C



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



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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

$$CO = Nc + 0,2;$$

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

$Nc - OD_{mean}$ для 3 **[CONTROL -]**

CO - Cut off, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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