

VetLine Бруцела

ІФА

Імуноферментний аналіз для якісного визначення антитіл проти бруцел у ветеринарній сироватці, об'єднаних зразках сироватки крові та пробах молока.

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

Номер продукту: BRUVT0050 (96 визначень)

1. ВВЕДЕННЯ

Види бруцел - це дуже маленькі, грамнегативні нерухомі бактерії (0,4-0,8 мкм в діаметрі і 0,4-3,0 мкм в довжину). Вони були названі на честь англійського військового лікаря Брюса Девіса, який виділив збудника 1887 на Мальті з селезінки померлого солдата з хвилеподібною лихоманкою.

Особливо важливі такі чотири види:

Brucella abortus:	збудник бруцельозу великої рогатої худоби
Brucella melitensis:	Збудник бруцельозу овець і кіз
Brucella suis:	Збудник бруцельозу свиней
Brucella canis:	збудник бруцельозу собак

Симптоми захворювання подібні у великої рогатої худоби, овець, кіз і свиней. Вівці менш сприйнятливі, тому аборти у цього виду спостерігаються рідше. Після зараження бруцельоз починається з клінічно нормальної фази, яка часто залишається непоміченою. Пізніше часто виникають запалення суглобів, іноді мастит. Основними симптомами бруцельозу є аборти, передчасні пологи та народження мертвого або слабкого потомства. У заражених биків може розвинути орхіт і епідидиміт. Збудник передається в основному при ковтанні і спаровуванні. Також можливе зараження через молоко, сечу та фекалії. У худобі бруцельоз може набути епідемічного характеру.

Бруцельоз – хвороба, що передається людині (зооноз). До групи ризику входять пастухи, фермери, тваринники, ветеринари та лабораторії.

Інфекції можуть бути діагностовані:
За родоспецифічністю ПЛР

Серологія: Виявлення антитіл методом ІФА

2. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

VetLine Brucella ІФА призначений для якісного визначення антитіл проти Brucella у ветеринарній сироватці, об'єднаних зразках сироватки та зразках молока.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Якісне імуноферментне визначення специфічних антитіл базується на методиці ІФА (імуноферментний аналіз).

Мікропланшети покриті специфічними антигенами для зв'язування відповідних антитіл зразка. Після промивання лунок для видалення всього незв'язаного матеріалу зразка додається кон'югат, мічений пероксидазою хрому (HRP). Цей кон'югат зв'язується із захопленими антитілами. На другому етапі промивання незв'язаний кон'югат видаляють. Імунний комплекс, утворений зв'язаним кон'югатом, візуалізується шляхом додавання субстрату тетраметилбензидину (ТМВ), який дає синій продукт реакції.

Інтенсивність цього продукту пропорційна кількості специфічних антитіл у зразку. Щоб зупинити реакцію, додають сірчану кислоту. Це створює жовтий колір кінцевої точки. Оптичну густину при 450/620 нм зчитують за допомогою пристрою для зчитування ІФА Мікропланшетів.

4. МАТЕРІАЛИ

4.1. Реагенти в наборі

- **мікропланшет:** 12 розривних стріпів із 8 лунками, покритих антигенами Brucella; в алюмінієвій фользі, що закривається.
- **Буфер для розведення зразка:** 1 флакон, що містить 100 мл фосфатного буфера (10 мМ) для розведення зразка; рН 7,2 ± 0,2; пофарбовані в жовтий колір; готовий до використання; білий ковпачок; ≤ 0,0015 % (об./об.) СМІТ/МІТ (3:1).
- **Стоп розчин:** 1 флакон, що містить 15 мл сірчаної кислоти, 0,2 моль/л; готовий до використання; червоний ковпачок.
- **Промивний буфер (20х концентрація):** 1 флакон 50 мл з а 20- кратн аний фосфат буфе (0,2 містить р М), ий рН 7,2 ± 0,2, для промивання лунок; білий ковпачок.

- **Кон'югат:** 1 флакон, що містить 20 мл протеїну A/G, міченого пероксидазою; пофарбовані в жовтий колір; готовий до використання; білий ковпачок; $\leq 0,02\%$ (об./об.) МІТ.
- **Розчин субстрату ТМБ:** 1 флакон містить 15 мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ), $< 0,1\%$; готовий до використання; жовтий ковпачок.
- **Позитивний контроль:** 1 флакон по 2 мл; пофарбовані в жовтий колір; готовий до використання; червоний ковпачок; $\leq 0,02\%$ (об./об.) МІТ.
- **Контроль пороговий:** 1 флакон по 3 мл; пофарбовані в жовтий колір; готовий до використання; зелений ковпачок; $\leq 0,02\%$ (об./об.) МІТ.
- **Негативний контроль:** 1 флакон по 2 мл; пофарбовані в жовтий колір; готовий до використання; синій ковпачок; $\leq 0,0015\%$ (об./об.) СМІТ/МІТ (3:1).

Для інформації про небезпеку та застереження див. 12.1

Для потенційно небезпечних речовин, будь ласка, перевірте паспорт безпеки.

4.2. Матеріали поставлені

- 1 Фольга для покриття
- 1 Інструкція із застосування (IFU)
- 1 Макет планшета

4.3. Необхідні матеріали та обладнання

- Зчитувач мікропланшетів ІФА, обладнаний для вимірювання поглинання при 450/620 нм
- Інкубатор 37 °С
- Ручне або автоматичне обладнання для промивання лунок мікропланшета
- Піпетки для доставки об'єму від 10 до 1000 мкл
- Вихровий змішувач пробірок
- Дистильована вода
- Одноразові пробірки

5. СТІЙКІСТЬ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати набір при 2...8 °С. Розкриті реагенти стабільні до терміну придатності, зазначеного на етикетці, за умови зберігання при 2...8 °С.

6. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо довести всі реагенти та зразки до кімнатної температури (20...25 °С) і перемішати їх перед початком тестування!

6.1. Мікропланшет

Стріпи, що відриваються, покриті антигенами Brcella. Одразу після видалення стріпів решту стріпів слід знову запечатати в алюмінієву фольгу разом із осушувачем, що постачається, і зберігати при 2...8 °С.

6.2. Промивний буфер (20x концентр.)

Розбавити промивний буфер 1 + 19; наприклад, 10 мл промивного буфера + 190 мл дистильованої води. Розведений буфер стабільний протягом 5 днів при кімнатній температурі (20...25 °С). У разі появи кристалів у концентраті підігрійте розчин до 37 °С, наприклад, на водяній бані. Добре перемішайте перед розведенням.

6.3. Розчин субстрату ТМБ

Реагент готовий до використання і повинен зберігатися при 2...8 °С, захищеному від світла. Розчин повинен бути безбарвним або мати легкий блакитний відтінок. Якщо субстрат стає синім, можливо, він забруднений і його слід викинути.

7. ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Для цього аналізу використовуйте зразки сироватки або молока.

- Сироватка: Для цього аналізу використовуйте зразки сироватки великої рогатої худоби або свині.
- Об'єднана сироватка: використовуйте до п'яти об'єднаних зразків. Можна об'єднати максимум п'ять зразків.

молоко: Для цього аналізу використовуйте зразки бичачого молока.

Зразки цільного молока можна використовувати після центрифугування протягом 15 хвилин при 2000 x g або 2 хвилин при 10 000 x g.

Зразок слід брати знизу кремового шару.

Уникайте повторного заморожування та розморожування.

Теплова інактивація зразків не рекомендується.

7.1. Розведення зразка

Перед аналізом усі зразки сироватки слід розвести 1+100 буфером для розведення зразків. Розподіліть 10 мкл зразка та 1 мл буфера для розведення зразків у пробірки, щоб отримати розведення 1+100, і ретельно перемішайте за допомогою вихрового міксера.

Об'єднані зразки сироватки слід розбавити буфером для розведення зразків.

Додайте, наприклад, 10 мкл кожного зразка (до 5 зразків) разом в 1 мл буфера для розведення зразків в одну пробірку та ретельно перемішайте за допомогою вихрового міксера.

Перед аналізом усі зразки молока слід розбавити 1+10 буфером для розведення зразків. Розлийте 100 мкл молока та 1 мл буфера для розведення зразків у пробірки, щоб отримати розведення 1+10, і ретельно перемішайте за допомогою вихрового міксера.

Оптимальне розведення молока може відрізнятись залежно від регіону та виду тварин. Воно може коливатися від нерозведеного до 1+20 і має визначатися кожною лабораторією самостійно. Описане розведення 1+10 слід розглядати як відправну точку для оцінки.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед проведенням аналізу уважно прочитайте інструкцію із застосування. Надійність результату залежить від суворого дотримання інструкції із застосування. Наведена нижче процедура перевірки перевірена лише для ручної процедури. У разі виконання тесту на автоматичних системах ІФА ми рекомендуємо збільшити кількість етапів промивання з трьох до п'яти та об'єм промивного буфера з 300 мкл до 350 мкл, щоб уникнути ефекту промивання. Зверніть увагу на главу 12. Перед початком аналізу план розподілу та ідентифікації для всіх зразків і стандартів/контролів (рекомендовано дублікати) має бути ретельно встановлений на схемі планшета, що постачається в наборі. Виберіть потрібну кількість мікротитраційних стріпів або лунок і вставте їх у тримач.

Виконайте всі етапи аналізу у вказаному порядку та без затримок.

Для дозування кожного стандарту/контролю та зразка слід використовувати чистий одноразовий наконечник.

Налаштуйте інкубатор на 37 ± 1 °C.

1. Розподіліть 100 мкл стандартів/контролів і розведених зразків у відповідні лунки. Залиште лунку А1 для бланка субстрату.
2. Накрийте лунки фольгою, що входить до набору.
3. **Інкубуйте протягом 1 години \pm 5 хвилин при 37 ± 1 °C.**
4. Після завершення інкубації зніміть фольгу, аспіруйте вміст лунок і промийте кожну лунку тричі 300 мкл промивного буфера. Уникайте переливів з реакційних лунок. Інтервал між промиванням і аспірацією повинен становити > 5 секунд. Наприкінці обережно видаліть залишки рідини, постукуючи стріпами по абсорбентному паперу перед наступним кроком!
Примітка: Миття - це важливо! Недостатнє промивання призводить до низької точності та помилкових результатів.
5. Розподіліть 100 мкл кон'югату в усі лунки, крім лунки А1 для бланка субстрату.
6. **Інкубуйте 30 хв при кімнатній температурі (20...25 °C).** Не піддавати впливу прямих сонячних променів.
7. Повторіть крок 4.
8. Розподіліть 100 мкл розчину субстрату ТМБ в усі лунки.
9. **Інкубуйте рівно 15 хв при кімнатній температурі (20...25 °C) у темряві.** Синій колір виникає внаслідок ферментативної реакції.
10. Розподіліть 100 мкл стоп-розчину в усі лунки в тому ж порядку та з такою ж швидкістю, як і для розчину субстрату ТМБ, таким чином відбувається зміна кольору з синього на жовтий.
11. Виміряйте поглинання при 450/620 нм протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

8.1. Вимірювання

Відрегулюйте пристрій для зчитування мікропланшетів ІФА на нуль за допомогою бланка субстрату.

Якщо з технічних причин пристрій для зчитування ІФА мікропланшетів не можна налаштувати на нуль за допомогою бланка субстрату, відніміть його значення поглинання з усіх інших вимірних значень поглинання, щоб отримати надійні результати!

Виміряйте поглинання всіх лунок при 450 нм і запишіть значення поглинання для кожного стандарту/контролю та зразка в плані планшета.

Рекомендується біхроматичне вимірювання з використанням еталонної довжини хвилі 620 нм.

Якщо можливо, розрахуйте середнє значення поглинання для всіх дублікатів.

9. РЕЗУЛЬТАТИ

9.1. Виконайте критерії перевірки

Щоб аналіз вважався дійсним, необхідно відповідати наступним критеріям:

- **Бланк субстрату:**Значення поглинання < 0,100
- **Негативний контроль:** Значення поглинання < 0,200 і < порогового значення
- **Контроль пороговий:**Значення поглинання 0,150 – 1,300
- **Позитивний контроль:** Значення поглинання > порогового

Якщо ці критерії не відповідають, тест недійсний і його необхідно повторити.

9.2. Підрахунок результатів

Граничне значення – це середнє значення поглинання визначень контрольного порогового значення.

приклад: Значення поглинання Пороговий контроль 0,44 + значення поглинання Пороговий контроль 0,42 = 0,86 / 2 = 0,43

Порогове = 0,43

9.2.1. Результати в одиницях [НТОД]

Значення поглинання зразка (середнє) x 10 = [Одиниці NovaTec = НТОД]
Порогове

приклад: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37$ НТОД

9.3. Інтерпретація результатів

Діапазони нормальних значень для цього ІФА повинні бути встановлені кожною лабораторією на основі її власної популяції зразків у географічних районах, що обслуговуються.

Наступні значення слід розглядати як орієнтир:

Порогове	10 НТОД	-
Позитивний	> 11 НТОД	Присутні антитіла проти збудника. Відбувся контакт з антигеном (збудником або вакциною).
Сумнівний	9 – 11 НТОД	Антитіла проти збудника чітко виявити не вдалося. Рекомендується повторити тест зі свіжим зразком через 2-4 тижні. Якщо результат неоднозначний, знову зразок оцінюється як негативний.
Негативний	< 9 НТОД	Зразок не містить антитіл проти збудника. Попередній контакт з антигеном (збудником або вакциною) малоімовірний.
Діагноз інфекційного захворювання не можна встановлювати на основі одного результату дослідження. Точний діагноз повинен брати до уваги клінічний анамнез, симптоматику, а також серологічні дані.		

10. СПЕЦИФІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результати відносяться до груп досліджуваних зразків; це не гарантовані характеристики.

Дані про продуктивність були встановлені з відібраними зразками сироватки. Через природу кон'югату білка A/G цей ІФА також повинен реагувати з іншими видами ссавців. Більш детальну інформацію можна отримати за запитом.

10.1. Точність

В аналізі	п	Середнє (E)	CV (%)
#1	24	0,577	4.14
#2	24	1,276	3.34
#3	24	1,200	2.75

Між аналізами	п	Середнє (НТОД)	CV (%)
#1	12	23.22	4.97
#2	12	20.13	6.05
#3	12	5.10	8.55

10.2. Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначається як ймовірність негативного результату аналізу за відсутності конкретного аналіту. Діагностична специфічність (велика рогата худоба та свиня): > 98 % (95 % довірчий інтервал: 88,78 % - 98,62 %)

10.3. Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначається як ймовірність позитивного результату аналізу в присутності конкретного аналіту. Діагностична чутливість (велика рогата худоба та свиня): > 98 % (95 % довірчий інтервал: 63,37 % - 98,62 %)

10.4. Вплив

Вплив з гемолітичними, ліпемічними або жовтяничними зразками не спостерігаються до концентрації 10 мг/мл гемоглобіну, 5 мг/мл тригліцеридів і 0,5 мг/мл білірубину.

10.5. Перехресна реактивність

Не можна виключити перехресні реакції.

11. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Бактеріальне забруднення або повторювані цикли заморожування-розморожування зразка можуть вплинути на значення поглинання.

12. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Тільки для ветеринарної діагностики in vitro.
- Усі матеріали людського чи тваринного походження слід розглядати та обробляти як потенційно інфекційні.
- Усі компоненти людського походження, які використовуються для виробництва цих реагентів, були перевірені на антитіла до ВІЛ, антитіла до ВГ С та HBsAg і були визнані неактивними.
- Не замінюйте реагенти або стріпи різних партій виробництва.
- Разом з реагентами цього тест-набору не можна використовувати реагенти інших виробників.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Використовуйте лише чисті наконечники піпеток, дозатори та лабораторний посуд.
- Не міняйте гвинтові кришки флаконів з реагентами, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Щільно закрийте флакони з реагентами одразу після використання, щоб уникнути випаровування та мікробного забруднення.
- Після першого відкриття та подальшого зберігання перевірте флакони з кон'югатом і стандартом/контролем на наявність мікробного забруднення перед подальшим використанням.
- Щоб уникнути перехресного забруднення та хибно підвищених результатів, піпетуйте зразки пацієнтів і дозуйте реагенти, не розбризкуючи їх акуратно в лунки.
- ІФА призначений лише для кваліфікованого персоналу, який знайомий з належною лабораторною практикою.

12.1. Правила безпеки для реагентів, що містять небезпечні речовини

Реагенти можуть містити СМІТ/МІТ (3:1) або МІТ (див. 4.1).

Тому застосовуються наступні заяви про небезпеку та застереження.

УВАГА

H317	Може викликати шкірну алергічну реакцію.
P261	Уникайте вдихання спрею
P280	Одягайте захисні рукавички/захисний одяг. У РАЗІ ПОТРАПЛЯННЯ НА ШКІРУ: промити великою кількістю води з милом.
P302+P352	У разі подразнення шкіри або висипу: Зверніться до лікаря.
P333+P313	Зніміть забруднення та вимийте його перед повторним використанням.
P362+P364	



Додаткову інформацію можна знайти в паспорті безпеки.

12.2. Зауваження щодо утилізації

Залишки хімічних речовин і препаратів зазвичай вважаються небезпечними відходами. Утилізація такого роду відходів регулюється національними та регіональними законами та правилами. Зв'яжіться з місцевими органами влади або компаніями з утилізації відходів, які нададуть поради щодо утилізації небезпечних відходів.

13. ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ

Каталожний №.: BRUVT0050 VetLine Brucella ІФА (96 визначень)

БІБЛІОГРАФІЯ

Wundt W. Krankheiten durch Brucellen. In: Gsell O. und Mohr W. Infektionskrankheiten. Springer Verlag Berlin Heidelberg (1968).

ГодфроїдЖ.Бруцельоз в дикій природі.Rev Sci Tech.2002, серпень; 21 (2): 277-86.

Salata, RA, Ravdin, JI (1985) Вид Brucella (Brucellosis). У: Манделл Г. Л., Дуглас RG, Bennett JE, EDS. Принципи і Практика інфекційних хвороб. Нью-Йорк: John Wiley, 1283-90

Ariza, J., Pellicer, T., Pallarés, R., Foz, A. та Gudiol, F. (1992) Специфічний профіль антитіл при бруцельозі людини. Clin Infect Dis. 1992 Січ;14(1):131-40.

Брукі П,Рауль Д.Ендокардит, викликаний рідкісними і вибагливими бактеріями.Clin Microbiol Rev.Січень 2001;14(1):177-207.






Гад Ель-Раб МО,Камбал А.М.Оцінка імуноферментного тесту на бруцели (ІФА) у порівнянні з бактеріологічним посівом та аглютинацією.Інфікувати.1998 Березень;36(2):197-201.

Корбель М.Дж. Бруцельоз: огляд. Emerg Infect Dis. 1997, квітень-червень;3(2):213-21.

СКОРОЧЕННЯ

СМІТ	5-хлор-2-метил-4-ізотіазолін-3-он
МІТ	2-метил-2Н-ізотіазол-3-он

СИМВОЛИ

	Виробник
ЛОТ	Номер лота
	Термін придатності
	Температура зберігання
REF	Номер каталожний
	Перегляньте інструкції з використання
MTP	Мікропланшет
CONJL	Кон'югат
CONTROL -	Негативний контроль
CONTROL +	Позитивний контроль
CUT OFF	Пороговий контроль
DIL	Буфер для розведення зразків
SOLN СТОП	Стоп розчин
SUB TMB	ТМБ розчин субстрату
WASH BUF 20x	Промивний буфер 20x концентрований
	Містить достатньо для «n» тестів

РЕЗЮМЕ ПРОЦЕДУРИ ДОСЛІДЖЕННЯ

СХЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ

VetLine Brucella ІФА
Підготовка до аналізу

Підготуйте реагенти та зразки, як описано.
Створіть план розподілу та ідентифікації для всіх зразків і стандартів/контролів на
Макеті планшету, що поставляється в наборі.
Виберіть потрібну кількість мікротитраційних стріпів або лунок і вставте їх у тримач.

Процедура аналізу

	Бланк субстрату (А1)	Негативний КОНТРОЛЬ	Пороговий КОНТРОЛЬ	Позитивний КОНТРОЛЬ	Зразок (розведення: див. пункт 7.1)
Негативний контроль	-	100 мкл	-	-	-
Контроль пороговий	-	-	100 мкл	-	-
Позитивний контроль	-	-	-	100 мкл	-
Зразок (розведення: див. пункт 7.1)	-	-	-	-	100 мкл
Накрийте лунки фольгою, що входить до набору Інкубуйте протягом 1 години при 37±1 °С Промийте кожну лунку тричі 300 мкл промивного буфера					
Кон'югат	-	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубуйте 30 хв при кімнатній температурі (20...25 °С) Не піддавати впливу прямих сонячних променів Промийте кожну лунку тричі 300 мкл промивного буфера					
Розчин субстрату ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубуйте рівно 15 хв при кімнатній температурі (20...25 °С) у темряві					
Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометричне вимірювання при 450 нм (референтна довжина хвилі: 620 нм)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Німеччина

тел. +49 (0) 6074-48760

Факс +49 (0) 6074-487629
с:

Електронна пошта:
ронна info@NovaTec-ID.com
Інтернет: www.NovaTec-ID.com

Версія BRUVT0050-engl,dt,es-1105020-TL