

VetLine Лейшманія

ІФА

Тільки для ветеринарної діагностики *in vitro*.

Імуноферментний аналіз для якісного визначення антитіл проти лейшманії у ветеринарній сироватці.

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: LEIVT0310 (96 визначень)

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Апарат VetLine Лейшманія ІФА призначений для якісного визначення антитіл проти Лейшманія у ветеринарній сироватці. Завдяки використанню багатовидового кон'югату він також повинен бути придатним для інших видів ссавців.

2. 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 (ТМБ), 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 щільність при 450/620 нм зчитують за допомогою пристрою для зчитування ІФА Мікропланшетів.

3. МАТЕРІАЛИ

- 3.1. Реагенти в наборі мікропланшет:** 12 стріпів з 8 лунками, що розриваються, вкритих антигенами Лейшманія; в алюмінієвій фользі, що закривається.
- **Буфер для розведення зразка:** 1 флакон, що містить 100 мл фосфатного буфера (10 мМ) для розведення зразка; рН $7,2 \pm 0,2$; пофарбовані в жовтий колір; готовий до використання; білий ковпачок; $\leq 0,0015$ % (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 містить 50 мл 20-кратної фосфат буфе (0,2 концентрації р М), рН $7,2 \pm 0,2$, для промивання лунок; біла ковпачок; 0,2% (мас./об.) 5-бром-5-нітро-1,3-діоксану.
 - **кон'югат:** 1 флакон, що містить 20 мл протеїну А/Г, 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 безпеку та застереження див. 11.1

- 3.2. Матеріали поставлені**
- 1 Фольга для покриття
 - 1 Інструкція із застосування (IFU)

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

4. СТІЙКІСТЬ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати набір при $2...8^{\circ}\text{C}$. Розкриті реагенти стабільні до терміну придатності, зазначеного на етикетці, за умови зберігання при $2...8^{\circ}\text{C}$.

5. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо довести всі реагенти та зразки до кімнатної температури ($20...25^{\circ}\text{C}$) і перемішати їх перед початком тестування!

5.1. Мікропланшет

Стріпи, що розриваються, покриті антигенами Лейшманія. Одразу після видалення стріпів решту стріпів слід знову запечатати в алюмінієву фольгу разом із осушувачем, що постачається, і зберігати при $2...8^{\circ}\text{C}$.

5.2. Промивний буфер (20х концентр.)

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

5.3. 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.

6. ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Використовуйте для цього аналізу зразки собачої сироватки. Якщо аналіз проводиться протягом 5 днів після відбору зразків, зразки повинні зберігатися при 2...8 °С; інакше їх слід розділити на аліквоти та зберігати в глибокій заморозці (-70...-20 °С). Якщо зразки зберігаються в замороженому вигляді, добре перемішайте розморожені зразки перед тестуванням. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Теплова інактивація зразків не рекомендується.

6.1. Розведення зразка

Перед аналізом усі зразки 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 міксеру.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед проведенням аналізу уважно прочитайте інструкцію із застосування. Надійність результату залежить від суворого дотримання інструкції із застосування, як описано. 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 розділ 11. Перед початком аналізу слід ретельно розробити план розподілу та ідентифікації для всіх зразків і стандартів/контролів (рекомендовано дублікати). 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 °С.

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 ± 5 хвилин при 37 ± 1 °С.**
4. Після завершення інкубації зніміть фольгу, аспіруйте вміст лунок і промийте кожну лунку тричі 300 мкл промивного буфера. Уникайте переливів з реакційних колодязів. Інтервал між промиванням і аспірацією повинен становити > 5 секунд. Наприкінці обережно видаліть залишки рідини, постукуючи стріпами по абсорбентному папері 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 °С).** 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 °С) 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.

7.1. 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. Рекомендується біхроматичне вимірювання з використанням еталонної довжини хвилі 620 нм.

Якщо можливо, розрахуйте середнє значення поглинання для всіх дублікатів.

8. РЕЗУЛЬТАТИ

8.1. Виконайте критерії перевірки

Для того, щоб аналіз вважався дійсним, необхідно суворо дотримуватися цих інструкцій із застосування та відповідати таким 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 > порогове значення

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

8.2. Підрахунок результатів

Порогове значення – це середнє значення поглинання визначень порогового контролю.

приклад: Значення поглинання порогового контролю 0,44 + значення поглинання порогового контролю 0,42 =
0,86 / 2 = 0,43 порогове= 0,43

8.2.1. Результати в одиницях [НТОД]

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

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

8.3. 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.
Негативний	< 9 НТОД	Зразок не містить антитіл проти збудника. Попередній контакт з антигеном (збудником або вакциною) малоімовірний.

Діагноз інфекційного захворювання не можна встановлювати на підставі одного результату дослідження. Точний діагноз повинен брати до уваги клінічний анамнез, симптоматику, а також серологічні дані.

9. СПЕЦИФІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

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

9.1. Точність

В аналізі	п	Середнє (E)	CV (%)
#1	24	0,463	4.25
#2	24	1,245	5.95
#3	24	0,727	3.59

Між аналізами	п	Середнє (НТОД)	CV (%)
#1	12	27.34	4.94
#2	12	29.33	6.54
#3	12	1.23	14.19

9.2. Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначається як ймовірність негативного результату аналізу за відсутності конкретного аналіту.

Діагностична специфічність собаки: 95,43 % (95 % довірчий інтервал: 91,19 % - 98,01 %)

9.3. Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначається як ймовірність позитивного результату аналізу в присутності конкретного аналіту.

Діагностична чутливість собак: 95,80 % (95 % довірчий інтервал: 90,47 % - 98,62 %)

9.4. 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.

9.5. Перехресна реактивність

Перехресні реакції, особливо на *Trypanosoma cruzi* (Chagas), не можна виключити.

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

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

11. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Необхідно суворо дотримуватися процедури тестування, інформації, запобіжних заходів і попереджень, наведених в інструкціях із застосування. Використання наборів тестів з аналізаторами та подібним обладнанням має бути перевірено. Будь-які зміни в дизайні, складі та процедурі тестування, а також будь-яке використання в поєднанні з іншими продуктами, не схваленими виробником, заборонені; користувач сам несе відповідальність за такі зміни. Виробник не несе відповідальності за помилкові результати та випадки з цих причин. Виробник не несе відповідальності за будь-які результати візуального аналізу зразків.
- 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 ВІС та HBsAg і були визнані нереактивними.
- Не замінійте 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.
- Для подальшого внутрішнього контролю якості кожна лабораторія повинна додатково використовувати відомі зразки.

11.1. Правила безпеки для реагентів, що містять небезпечні речовини

Реагенти можуть містити СМІТ/МІТ (3:1) або МІТ (див. 3.1).

Тому застосовуються наступні положення про безпеку та запобіжні заходи.

	УВАГА	H317	Може викликати шкірну алергічну реакцію.
		P261	Уникайте вдихання спрею.
		P280	Одягайте захисні рукавички/захисний одяг.
			У РАЗІ ПОТРАПЛЕННЯ НА ШКІРУ: промити великою
		P302+P352	кількістю води з милом.
		P333+P313	У разі подразнення шкіри або висипу: Зверніться за медичною допомогою/порадою.
		P362+P364	Зняти забруднений одяг і випрати його перед повторним використанням.

Реагенти можуть містити 5-бром-5-нітро-1,3-діоксан (див. 3.1).

Таким чином, застосовуються наступні заяви про безпеку та застереження.

	УВАГА	H315	Викликає подразнення шкіри.
		H319	Викликає серйозне подразнення очей.
		P280	Одягайте захисні рукавички/захисний одяг.
		P302+P352	У РАЗІ ПОТРАПЛЕННЯ НА ШКІРУ: промити великою кількістю води з милом.
			ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промийте водою протягом кількох хвилин.
		P305+P351+P338	Зняти контактні лінзи, якщо є і це легко зробити. Продовжуйте полоскання.
		P337+P313	Якщо подразнення очей не проходить: Зверніться до лікаря.

Додаткову інформацію можна знайти в паспорті безпеки.

11.2. 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.

Інформацію про пакувальні матеріали див. у розділі ПАКУВАЛЬНІ МАТЕРІАЛИ.

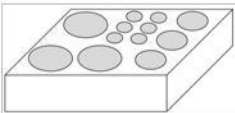
12. ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ

Виробник №: LEIVT0310 VetLine Лейшманія ІФА (96 визначень)

СКОРОЧЕННЯ

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

ПАКУВАЛЬНІ МАТЕРІАЛИ

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	 PAP 22
SOLN STOP WASH BUF 20x SUB TMB DIL CONJL CONTROL + CONTROL - CUT OFF  HDPE 2  PP 5			MTP  PET / ALU / LDPE 90

Ключові символи

	Виробник
LOT	Номер лота
	Термін придатності
	Температура зберігання
REF	Номер каталожний
	Зверніться до інструкцій з використання
MTP	Мікропланшет
CONJL	Кон'югат
CONTROL -	Контроль негативний
CONTROL +	Контроль позитивний
CUT OFF	Контроль пороговий
DIL	Буфер розчинника зразка
SOLN STOP	Стоп розчин
SUB TMB	ТМБ розчин субстрату
WASH BUF 20x	Промивний розчин 20х концентрований
	Містить достатньо для «n» тестів

РЕЗЮМЕ ПРОЦЕДУРИ ВИПРОБУВАННЯ

СХЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ

VetLine Лейшманія ІФА

Підготовка до аналізу

Підготуйте реагенти та зразки, як описано. Встановіть план розподілу та ідентифікації для всіх зразків і стандартів/контролів. Виберіть потрібну кількість мікротитраційних стріпів або лунок і вставте їх у тримач.
--

Процедура аналізу

	Бланк субстрату (A1)	Негативний КОНТРОЛЬ	Пороговий КОНТРОЛЬ	Позитивний КОНТРОЛЬ	Зразок (розбавлений 1+100)
Негативний контроль	-	100 мкл	-	-	-
Контроль пороговий	-	-	100 мкл	-	-
Позитивний контроль	-	-	-	100 мкл	-
Зразок (розбавлений 1+100)	-	-	-	-	100 мкл
Накрийте лунки фольгою, що входить до набору Інкубуйте протягом 1 години при 37±1 °C 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 °C) Не піддавати впливу прямих сонячних променів Промийте кожну лунку тричі 300 мкл промивного буфера					
Субстрат ТМБ розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубуйте рівно 15 хв при кімнатній температурі (20...25 °C) у темряві					
Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометричне вимірювання при 450 нм (референтна довжина хвилі: 620 нм)					

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Німеччина

Тел.: +49 6074 23698-0

Факс: +49 6074 23698-900

Електронна пошта: Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

сайт: Clinical.goldstandarddiagnostics.com