

VetLine Борелія

ІФА

Імуноферментний аналіз для якісного визначення антитіл проти борелій 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: BORVT0040 (96 визначень)

1. ВВЕДЕННЯ

Хвороба Лайма (бореліоз) — кліщове бактеріальне захворювання домашніх тварин і людини. Викликається спірохетами групи *Borrelia burgdorferi sensu lato*. У Європі найбільш часто ізольованими патогенними геновидами людей і собак є *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* і *Borrelia burgdorferi sensu stricto*.

Боррелії - це спірально закручені, гнучкі, дуже рухливі бактерії. Завдяки обертанню своїх осьових ниток (периплазматичних джгутиків) вони здатні ефективно штовпородібно рухатися крізь в'язке середовище (сироватку). Таким чином, вони можуть поширюватися по всьому тілу протягом декількох днів або тижнів після інфікування.

Збудники переносять різні види кліщів роду *Ixodes*. У Європі *Ixodes ricinus* є найважливішим переносником. Однак рівень зараження бореліями різниться залежно від регіону. В ендемічних районах Німеччини приблизно 3-7 % личинок і 10-34 % німф і дорослих кліщів заражені *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Природними резервуарами є дикі тварини, в тому числі гризуни, а також багато інших дрібних ссавців і птахів. Від цих господарів кліщі беруть їжу (кров).

Оскільки собаки часто відвідують місця проживання кліщів, вони страждають більше, ніж люди. Типовими місцями проживання кліщів є узлісся, чагарники, підлісок і висока трава; але інфікованих кліщів також можна знайти в громадських парках.

Симптоми хвороби Лайма у собак включають лихоманку, апатію, втрату апетиту та анорексію, а також періодичну та мінливу кульгавість та поліартрит. Характерний висип або кругла ділянка почервоніння навколо укусу (хронічна мігруюча еритема), які спостерігаються у людини, можуть бути відсутні або не помічені через волосяний покрив або темну пігментацію.

2. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

VetLine *Borrelia* ІФА призначений для якісного визначення антитіл проти *Borrelia* у ветеринарній сироватці.

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 видалюють. 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 густину при 450/620 нм зчитують за допомогою пристрою для зчитування ІФА Мікропланшетів.

4. МАТЕРІАЛИ

- 4.1. Реагенти в наборі мікропланшет:** 12 розривних 8-луноквих стріпів, покритих антигенами *Borrelia*; 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 (20x концентрація):** 1 флакон 50 мл з а 20- концентров фосфат буфе (0,2 містить кратн аний 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; червона 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. 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'ємів 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 розриваються, покриті антигенами *Borrelia*. 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 ПРОБ

Використовуйте для цього аналізу зразки собачої сироватки. Якщо аналіз проводиться протягом 5 діб 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.

7.1. 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.

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 A1 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 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 A1 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]

$\frac{\text{Значення поглинання зразка (середнє)} \times 10}{\text{порогове}} = [\text{Одиниці NovaTec} = \text{НТОД}]$

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

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:

Пороговий	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) мало ймовірний.

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 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.

10.1. Точність

В аналізі	п	Середнє (E)	CV (%)
#1	24	0,517	4.00
#2	24	1,790	4.23
#3	24	2,339	9.04

Між

аналізами	п	Середнє (НТОД)	CV (%)
#1	12	37.2	4.17
#2	12	45.3	9.28
#3	12	1.90	9,94

10.2. Діагностична специфічність

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

Діагностична специфічність собак: 92,86 % (95 % довірчий інтервал: 66,13 % - 99,82 %)

10.3. Діагностична чутливість

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

Діагностична чутливість собак: 95,00 % (95 % довірчий інтервал: 75,13 % - 99,87 %)

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

Перехресні реакції, особливо проти спірохет, не можна виключити.

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 ВГС та HBsAg і були визнані нереактивними.
- 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

Кат.№: BORVT0040 VetLine Borrelia ІФА (96 визначень)

БІБЛІОГРАФІЯ

Burgdorfer W., Barbour AG, Haves SF, Benach JL, Grunwaldt E., Davis JP (1982) Хвороба Лайма - кліщовий спірохетоз? Наука 216, 1317-1319






Wilske B., Preac-Mursic V., Fuchs R., Schierz G. (1990) Diagnostik der Lyme Borreliose. Diagnose und Labor, Laboratoriumsblätter 40, 24-36

Novius JWR, Novius KE, Oei A., Houwers DJ, van Dam AP (2000) Антитіла проти специфічних білків та іммобілізуюча активність проти трьох штамів *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato можуть бути виявлені у собак із симптомами, але не у інфікованих безсимптомних собак. J Clin Microbiol 38, 2611-2621

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
МТР	Мікропланшет
CONJL	Кон'югат
CONTROL -	Негативний контроль
CONTROL +	Позитивний контроль
CUT OFF	Пороговий контроль
DIL	Буфер для розведення зразків
SOLN СТОП	Стоп розчин
SUB ТМБ	ТМБ розчин субстрату
WASH BUF 20x	Промивний буфер 20x концентрований
	Містить достатньо для «n» тестів

РЕЗЮМЕ ПРОЦЕДУРИ ДОСЛІДЖЕННЯ СХЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ

VetLine Borrelia 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 (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					
Розчин субстрату ТМБ	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)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6

 63128 Dietzenbach, Німеччина

тел. +49 (0) 6074-48760

Факс +49 (0) 6074-487629

с:

Електронна пошта: info@NovaTec-ID.com

а:

Інтернет: www.NovaTec-ID.com