

НАБІР РЕАГЕНТІВ

АНТИТІЛА ДО ЦУКРОВИХ АНТИГЕНІВ *BRUCELLA BOVIS*

Brucella Ab (Bovine) ELISA

Каталог. №: **EIA-2497**

Кількість: **96**

Дата випуску інструкції: **2019/03**

Версія **11.0**



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ВСТУП

Незважаючи на програми ліквідації бруцельозу в багатьох частинах світу, зараження бруцельоз великої рогатої худоби (*Brucella abortus*) залишається ендемічним у багатьох популяцій великої рогатої худоби, що призводить до серйозних економічних втрат.

Серологічна ідентифікація великої рогатої худоби, зараженої *Brucella*, проводиться шляхом скринінгу зразків сироватки на антитіла проти бактеріальних аглютинуючих антигенів. Ці тести мають деякі недоліки: вони трудомісткі, нечутливі і важко читаються. Для виявлення антитіл у зразках молока потрібні більш чутливі тест-системи. Ця тестова система ІФА на основі моноклональних антитіл призначена для використання як швидкий скринінг-тест для виявлення антитіл до *Brucella* у зразках сироватки та молока зараженої великої рогатої худоби.

2. ПРИЗНАЧЕННЯ ТЕСТОВОГО НАБОРУ

Цей діагностичний тест призначений для ідентифікації антитіл до цукрових антигенів *Brucella bovis*, у зразках сироватки та молока.

На відміну від тест-систем, які використовують аглютинуючий бактеріальний антиген, цей частковий моноклональний ІФА має дуже високу чутливість та специфічність (згідно зі стандартами SAT, E.C. та Weybridge).

3. ПРИНЦИП ТЕСТОВОГО НАБОРУ

Розведені зразки молока або сироватки додають у попередньо покриті лунки.

- Якісний

Зразок сироватки додається (розведений 1:150) у лунки покритого планшету. Зразок молока додається (1:2) у лунки покритого планшету.

- Кількісний

Зразок сироватки, також можна титрувати, використовуючи 3-етапне розведення, починаючи з розведення 1:30 (—> 1:90 —> 1:270 —> 1:810). Зразок молока, також можна титрувати, використовуючи 3-етапне розведення, починаючи з розведення 1:2 (—> 1:6 —> 1:18 —> 1:54).

Після інкубації та відповідного промивання додають кон'югат моноклонального анти-бичачого IgG-антитіла і планшети знову інкубують. Після відповідного миття додається субстрат. Через кілька хвилин кольорову реакцію припиняють і планшети негайно зчитують при 450 нм.

4. ВМІСТ

EIA-2497	
12 x 8	Мікротитрові смужки покриті полісахаридним антигеном <i>Brucella</i>
1 x	Тримач для смужок
1 x 18 мл	Буфер ІФА (зелена кришка)
1 x 12 мл	Антивидові антитіла, кон'юговані HRPO (червона кришка)
1 x 0,5 мл	Інактивованій позитивний контроль (ліофілізований) (фіолетова кришка)
1 x 1,0 мл	Негативний контроль (ліофілізований) (срібна кришка)
1 x 20 мл	Миючий розчин (200x концентрований) (чорна кришка), Розведений у деіонізованій воді перед використанням!
1 x 8 мл	Субстрат А (біла кришка)
1 x 8 мл	Субстрат В (синя кришка)
1 x 8 мл	Стоп-розчин (жовта кришка)
1 x	Пластикова ущільнювальна кришка
1 x	Інструкція з використанням

4.1 Необхідні матеріали (не постачаються в наборі)

- Мікротитровий планшет з круглим дном
- прецизійна піпетка 0.1 – 5 мкл
- прецизійна піпетка 10 – 200 мкл
- прецизійна піпетка 200 – 1000 мкл
- наконечники для піпетки та чисті контейнери/пробірки
- Планшетний зчитувач ІФА

5. ОБРОБКА І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Набір потрібно зберігати при температурі 4°C.

Після відкриття, слід використати впродовж 10 днів.

Зразки можна використовувати свіжими або зберігати при температурі нижче -20°C перед використанням.

Позитивні та негативні контролю можна зберігати після відновлення у аліквотах при температурі -20°C та використати до закінчення терміну придатності. уникати повторного замороження-розморозження, оскільки це збільшує неспецифічну реактивність.

6. ПРОТОКОЛ МИТТЯ

У ELISA некомплексовані компоненти потрібно видаляти між кожним етапом інкубації. Це здійснюється відповідним миттям. Слід підкреслити, що кожен етап промивання повинен виконуватися обережно, щоб гарантувати відтворені результати в аналізі та між аналізами. Важливо дотримуватися процедур миття, описаних нижче. Миття може здійснюватися вручну або за допомогою автоматичного обладнання. Автоматичне миюче обладнання зазвичай дає кращий результат.

Ручне промивання

- 1) Очистіть кожну лунку, повернувши мікротитрову пластину догори дном, після чого слід вертикальним рухом вниз видалити буфер.
- 2) Наповніть усі лунки з 250 мкл миючого розчину
- 3) Цикл миття (етап 1 та 2) потрібно провести щонайменше 5 разів
- 4) Поверніть планшет догори дном та очистіть лунки вертикальними рухами.
- 5) Розмістіть планшет на абсорбуючому паперовому рушнику та постукайте планшетом, щоб видалити залишки миючого розчину з лунки
- 6) Подбайте, щоб кожна лунка була сухою під час внесення наступного реагенту

Миття за допомогою автоматичного обладнання

Коли використовуєте автоматичне обладнання для миття планшетів, перевірте, чи всі лунки повністю аспіровані і чи правильно відводиться промивний розчин, досягаючи краю кожної лунки протягом кожного циклу промивання. Вошер повинен бути запрограмований на виконання щонайменше 5 циклів миття.

7. ПІДГОТОВКА

- Перш ніж використовувати необхідні реагенти, вийміть їх з набору і покладіть на стіл на ± 15 хвилин при кімнатній температурі (± 21 °C), не піддаючи їх впливу прямих сонячних променів або (інших) джерел тепла.
- Буфер, контролю, стандарти та кон'югати потрібно обережно потрусити перед використанням. Для того, щоб розчинити /перемішати компоненти, які можуть осісти.
- Якщо рідину потрібно змішати в тестовій лунці, обережно потрусіть, постукаючи пальцями по лунці або повторно суспендуйте останнім наконечником для піпетки, що використовується для цієї конкретної лунки. Уникайте забруднення через розбризкування та не допускайте потрапляння рідини всередину самої піпетки.
- Після використання, поставте реагенти негайно назад при температурі 4°C - 8°C.

8. ЯКІСНИЙ ПРОТОКОЛ ТЕСТУВАННЯ - СИРОВАТКА

До початку проведення тесту прочитайте розділ «Приготування»

1. Відкрийте упаковку зі смужками та вийміть смужки. Решту смужок герметично упакуйте та зберігайте при температурі +4°C та використовуйте їх протягом 10 днів. Промийте мікротитрові смужки 5 разів миючим розчином, відповідно до протоколу миття.

Миючі розчини, що надаються повинні бути розведені 200x у воді. (5MΩ)!

Використовуйте прецизійну піпетку 0.1-5 мкл, 10-200 мкл та 200-1000 мкл та використовуйте чистий наконечник для піпетки **перед** піпетуванням буферу, контролю, зразків, кон'югату та субстрату.

2. **Відновіть** безпосередньо перед використанням **позитивного**

- контролю** (фіолетова кришка) у 0,5 мл води. (5MΩ вода), поділіть на аликвоти та після повного розчинення негайно зберігайте при температурі -20°C до використання. Уникайте циклів розмороження-замороження.
- Відновіть** безпосередньо перед використанням **негативного контролю** (срібна кришка) у 1,0 мл води (5MΩ вода), розділіть на аликвоти, та після повного розчинення негайно зберігайте при температурі -20°C до використання. Уникайте циклів розмороження-замороження.
 - Розведіть позитивний контроль 1:150** у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).
Приклад: - необхідне попереднє розведення:
 - Додати 90 мкл буферу у лунку **1А**, додати 10 мкл позитивного контролю у лунку **1А** та добре перемішати.
 - Додати 140 мкл буферу у лунку **1В**, додати 10 мкл попереднього розведення лунки **1А** у лунку **1В** та добре перемішайте (**тільки переносити це розведення у покритий планшет на етапі 8**).
 - Розвести **негативний контроль 1:150** у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).
Приклад: - необхідне попереднє розведення:
 - додати 90 мкл буфера у лунку **1С**, додати 10 мкл негативного контролю у лунку **1С** та добре перемішати.
 - додати 140 мкл буфера у лунку **1D**, додати 10 мкл попереднього розведення лунки **1С** у лунку **1D** та добре перемішати (**тільки переносити це розведення у покритий планшет на етапі 8**).
 - Розвести **кожен зразок 1:150** у буфері ІФА (зелена кришечка) у планшеті з круглим дном (не постачається).
Приклад: - необхідне попереднє розведення:
 - додати 90 мкл буфера до лунки **1Е**, додати 10 мкл зразка до лунки **1Е** та добре перемішати.
 - додати 140 мкл буфера до лунки **1F**, додати 10 мкл попереднього розведення лунки **1Е** у лунку **1F** та добре перемішати (**тільки переносити це розведення у покритий планшет на етапі 8**).
 - Візьміть 2 лунки як контроль субстрату додайте тільки 140 мкл буферу ІФА (зелена кришка) у ці лунки.

- Перенесіть 100 мкл всіх розведень до мікротитрових смужок, покритих *Brucella*.
- Закрийте та інкубуйте протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
- Помити планшет 5 разів відповідно до протоколу дивитися розділ 6.
- Внести 100 мкл розведеного антивидового антитіла кон'югованого НРРО до усіх лунок.
- Закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C дивитися розділ 6.
- Помити планшет відповідно до протоколу миття.
- Обережно змішати рівні частини буферу А (біла кришка) та буферу В (синя кришка). **Готувати тільки перед використанням! Підготувати тільки необхідну кількість. Субстрат можна тільки використовувати протягом 1 години після змішування.**
- Внесіть 100 мкл розчину субстрату у кожну лунку.
- Інкубувати 10-13 хвилин у темряві (напр., накрити лунки листком паперу) при кімнатній температурі (21°C). Переконайтеся, що негативні контроли не стають занадто темними.
- Додати 50 мкл у кожну лунку; добре перемішати.
- Зчитайте значення абсорбції негайно (протягом 10 хвилин!) при 450 нм, використовуючи 620 нм в якості зразка на ІФА зчитувачі. Використовуйте контроль субстрату в якості бланків.

Примітка: якщо піпетувати безпосередньо у покритий планшет ІФА з невеликою кількістю зразків (<6), переконайтеся, що перше розведення було зроблене у мікротитровому планшеті з круглим дном, а другий етап слід робити безпосередньо у покритому планшеті ІФА.

9. КІЛЬКІСНИЙ ПРОТОКОЛ ТЕСТУВАННЯ - СИРОВАТКА

Перед початком цього тестування прочитайте «Підготовку»

- Відкрийте пакет зі смужками та вийміть необхідну кількість. Решту накрийте герметичною стрічкою та зберігайте їх при температурі +4°C, та використайте їх впродовж 10 днів.
Промийте мікротитрові смужки 5 разів промивним розчином, відповідно до протоколу миття.
Міочки розчини, які постачаються повинні бути розведеними 200х у бідистильованій воді !
Використовуйте прецизійну піпетку 0.1 – 5 мкл, 10-200 мкл та 200-1000 мкл та використовуйте чистий наконечник для піпеток **перед**

- піпетуванням буфера, контролю, зразків, кон'югату та субстрату.
- Відновити** безпосередньо перед використанням **позитивний контроль** (фіолетова кришка) у 0,5 мл бідистильованої води (5MΩ), розділити на аликвоти, та зберігати після повного розчинення при температурі -20°C до використання. Уникайте циклів замороження та розмороження.
 - Відновити** безпосередньо перед використанням **негативний контроль** (срібна кришка) у 1.0 мл бідистильованої води (5MΩ), розділити на аликвоти, та зберігати після повного розчинення при температурі -20°C до використання. Уникайте циклів замороження та розмороження.
 - Зробіть **попереднє розведення позитивного контролю** (фіолетова кришка) у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).
Приклад: - Додати 80 мкл буферу у лунку **1А** та додати 20 мкл позитивного контролю у лунку **1А**.
 - Зробіть **попереднє розведення негативного контролю** (срібна кришка) у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).
Приклад: - Додати 8 мкл буферу у лунку **1В** та додати 20 мкл негативного контролю у лунку **1В**.
 - Зробіть **попереднє розведення кожного зразка** у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).
Приклад: - додати 80 мкл буфера у лунку **1С** та додати 20 мкл зразка у лунку **1С**.
 - Візьміть 2 лунки як контроль субстрату, додайте тільки 140 мкл буферу ІФА (зелена кришка) у ці лунки.
-
- До розведення **позитивного контролю** додайте 125 мкл буферу у лунку **1А**. Та 100 мкл у **1В, 1С, 1D** покритої мікротитрової смужки.
 - До розведення **негативного контролю** додайте 125 мкл буферу у лунку **1Е**. Та 100 мкл до **1F, 1G, 1H** покритої мікротитрової смужки.
 - Додайте до розведень зразків 125 мкл буферу до іншої лунки **2А** та **2Е**. Та 100 мкл до **2В, 2С, 2D** та **2F, 2G, 2H** (залежить від кількості зразків) покритої мікротитрової смужки.
-
- Зробіть 3-етапне розведення **позитивного контролю** у покритій мікротитровій смужці, починаючи 1:30 -> 1:90 -> 1:270 -> 1:810.
Приклад: - Внесіть 25 мкл позитивного контролю від етапу 4 до лунки **1А** мікротитрової смужки.
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1В**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1С**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1D**
 - добре перемішайте та викиньте 50 мкл.
 - Зробіть 3-етапне розведення **негативного контролю** у покритій мікротитровій смужці, починаючи 1:30 -> 1:90 -> 1:270 -> 1:810.
Приклад: - Внесіть 25 мкл позитивного контролю від етапу 5 до лунки **1Е** мікротитрової смужки.
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1F**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1G**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1H**
 - добре перемішайте та викиньте 50 мкл.
 - Зробіть 3-етапне розведення **кожного зразка** у покритій мікротитровій смужці, починаючи 1:30 -> 1:90 -> 1:270 -> 1:810.
Приклад: - Внесіть 25 мкл позитивного контролю від етапу 6 до лунки **2А та/або 2Е** мікротитрової смужки.
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **2В і/або 2F**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **2С і/або 2G**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **2D і/або 2H**
 - добре перемішайте та викиньте 50 мкл.
 - Внесіть 100 мкл контролю субстрату етапу 7 до останніх 2 лунок мікротитрової смужки.
 - Щільно закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
 - Промити планшет 5 разів відповідно до протоколу миття дивитися розділ 6.
 - Внесіть 100 мкл розведеного антивидового антитіла, кон'югованого НРРО до усіх лунок.
 - Щільно закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
 - Промити планшет відповідно до протоколу миття дивитися розділ 6.
 - Обережно змішайте рівні частини буферу А (біла кришка) та буферу В

(синя кришка). **Готувати негайно перед використанням! Готувати тільки необхідну кількість. Субстрат можна використовувати тільки протягом 1 годин після змішування.**

- Внесіть 50 мкл розчину субстрату у кожну лунку.
- Інкубувати 10-13 хвилин у термоямі (напр., накрити лунки листком паперу) при кімнатній температурі (21°C). Переконайтеся, що негативні не стають занадто темними.
- Додати 50 мкл стоп-розчину у кожну лунку; добре перемішати.
- Зчитайте значення абсорбції негайно (протягом 10 хвилин!) при 450 нм. Використовуючи 620 нм як зразок на ІФА зчитувачі. Використовуйте контролю субстрату в якості бланків.

10. ЯКІСНИЙ ПРОТОКОЛ ТЕСТУВАННЯ - МОЛОКО

Перед початком проведення тесту прочитайте «Приготування»
До початку проведення тесту прочитайте розділ «Приготування»

- Відкрийте упаковку зі смужками та вийміть смужки. Решту смужок герметично упакуйте та зберігайте при температурі +4°C та використовуйте їх протягом 10 днів. Промийте мікротитрові смужки 5 разів м'яким розчином, відповідно до протоколу миття.

М'які розчини, що надаються повинні бути розведені 200x у воді. (5MΩ)!

- Використовуйте прецизійну піпетку 0.1-5 мкл, 10-200 мкл та 200-1000 мкл та використовуйте чистий наконечник для піпетки **перед** піпетуванням буфера, контролю, зразків, кон'югату та субстрату.
- Відновіть** безпосередньо перед використанням **позитивного контролю** (фіолетова кришка) у 0.5 мл води. (5MΩ вода), поділіть на аліквоти та після повного розчинення негайно зберігайте при температурі -20°C до використання. Уникайте циклів розмороження-замороження.
 - Відновіть** безпосередньо перед використанням **негативного контролю** (срібна кришка) у 1.0 мл води (5MΩ вода), розділіть на аліквоти, та після повного розчинення негайно зберігайте при температурі -20°C до використання. Уникайте циклів розмороження-замороження.
 - Для того, щоб уникнути неправильних позитивних реакцій, потрібно використовувати **знежирені** зразки. Центрифугуйте зразки молока протягом 15 хвилин при 2500g та візьміть зразок з-під шару жиру.
 - Розвести позитивний контроль 1:150** у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).

Приклад: - необхідне попереднє розведення:

- додати 90 мкл буфера у лунку **1A**, додати 10 мкл зразка у лунку **1A** та добре перемішати.

- додати 140 мкл буфера у лунку **1B**, додати 10 мкл попереднього розведення лунки **1A** у лунку **1B** та добре перемішати (**тільки переносити це розведення у покритий планшет на етапі 9**).

- Розвести **негативний контроль 1:150** у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).

Приклад: - необхідне попереднє розведення:

- додати 90 мкл буфера у лунку **1C**, додати 10 мкл негативного контролю у лунку **1C** та добре перемішати.

- додати 140 мкл буфера у лунку **1D**, додати 10 мкл попереднього розведення лунки **1C** у лунку **1D** та добре перемішати (**тільки переносити це розведення у покритий планшет на етапі 9**).

- Розвести **кожен зразок 1:2** у буфері ІФА (зелена кришечка) у планшеті з круглим дном (не постачається).

Приклад:

- додати 70 мкл буфера до лунки **1C**, додати 70 мкл зразка до лунки **1C** та добре перемішати.

Об'єднані зразки слід тестувати нерозведеними.

- Візьміть 2 лунки як контролю субстрату додайте тільки 140 мкл буфера ІФА (зелена кришка) у ці лунки.

- Перенесіть 100 мкл всіх розведень до мікротитрових смужок, покритих *Brucella*.
- Щільно закрийте та інкубуйте протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
- Помити планшет 5 разів відповідно до протоколу дивитися розділ 6.
- Внести 100 мкл розведеного антивидового антитіла кон'югованого HRPO до усіх лунок.
- Щільно закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
- Помити планшет відповідно до протоколу миття дивитися розділ 6.
- Обережно змішати рівні частини буфера А (біла кришка) та буфера В (синя кришка). **Готувати тільки перед використанням! Підготувати**

тільки необхідну кількість. Субстрат можна тільки використовувати протягом 1 години після змішування.

- Внесіть 100 мкл розчину субстрату у кожну лунку.
- Інкубувати 10-13 хвилин у термоямі (напр., накрити лунки листком паперу) при кімнатній температурі (21°C). Переконайтеся, що негативні контролю не стають занадто темними.
- Додати 50 мкл у кожну лунку; добре перемішати.
- Зчитайте значення абсорбції негайно (протягом 10 хвилин!) при 450 нм, використовуючи 620 нм в якості зразка на ІФА зчитувачі. Використовуйте контролю субстрату в якості бланків.

Примітка: якщо піпетувати безпосередньо у покритий планшет ІФА з невеликою кількістю зразків (<6), переконайтеся, що перше розведення було зроблене у мікротитровому планшеті з круглим дном, а другий етап слід робити безпосередньо у покритому планшеті ІФА.

11 КІЛЬКІСНИЙ ПРОТОКОЛ ТЕСТУВАННЯ - МОЛОКО

Перед початком цього тестування прочитайте «Підготовку»

- Відкрийте пакет зі смужками та вийміть необхідну кількість. Решту накрийте герметичною стрічкою та зберігайте їх при температурі +4°C, та використовуйте їх впродовж 10 днів. Промийте мікротитрові смужки 5 разів промивним розчином, відповідно до протоколу миття.

М'які розчини, які постачаються повинні бути розведеними 200x у бідистильованій воді!

- Використовуйте прецизійну піпетку 0.1 – 5 мкл, 10-200 мкл та 200-1000 мкл та використовуйте чистий наконечник для піпеток **перед** піпетуванням буфера, контролю, зразків, кон'югату та субстрату.
- Відновити** безпосередньо перед використанням **позитивний контроль** (фіолетова кришка) у 0,5 мл бідистильованої води (5MΩ), розділити на аліквоти, та зберігати після повного розчинення при температурі -20°C до використання. Уникати циклів замороження та розмороження.
 - Відновити** безпосередньо перед використанням **негативний контроль** (срібна кришка) у 1.0 мл бідистильованої води (5MΩ), розділити на аліквоти, та зберігати після повного розчинення при температурі -20°C до використання. Уникати циклів замороження та розмороження.
 - Щоб уникнути неправильних позитивних реакцій потрібно використовувати **знежирені** зразки. Центрифугувати зразки молока протягом 15 хвилин при 2500g та взяти зразок з-під шару жиру.
 - Зробіть попереднє розведення **позитивного контролю** (фіолетова кришка) у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).

Приклад: - Додати 80 мкл буфера у ряд **1A** та додати 20 мкл позитивного контролю у лунку **1A**.

- Зробіть попереднє розведення **негативного контролю** (срібна кришка) у буфері ІФА (зелена кришка) у планшеті з круглим дном (не постачається).

Приклад: - Додати 80 мкл буфера у ряд **1B** та додати 20 мкл негативного контролю у лунку **1B**.

- Візьміть 2 лунки як контролю субстрату, додайте тільки 140 мкл буфера ІФА (зелена кришка) у ці лунки.

- До розведення **позитивного контролю** додайте 125 мкл буфера у ряд **1A** та 100 мкл у **1B, 1C, 1D** покритої мікротитрової смужки.
- До розведення **негативного контролю** додайте 125 мкл буфера у ряд **1E** та 100 мкл до **1F, 1G, 1H** покритої мікротитрової смужки.
- Додайте до розведень **зразків 75 мкл буфера** до іншого ряду **2A** та **2E**. Та 100 мкл до **2B, 2C, 2D** та **2F, 2G, 2H** (залежить від кількості зразків) покритої мікротитрової смужки.
- Зробіть 3-етапне розведення **позитивного контролю** у покритій мікротитровій смужці, починаючи 1:30 -> 1:90 -> 1:270 -> 1:810.

Приклад: - Внесіть 25 мкл позитивного контролю від етапу 2 до лунки **1A** мікротитрової смужки.

- добре перемішайте та додайте 50 мкл до лунки **1B**

- добре перемішайте та додайте 50 мкл до лунки **1C**

- добре перемішайте та додайте 50 мкл до лунки **1D**

- добре перемішайте та викиньте 50 мкл.

- Зробіть 3-етапне розведення **негативного контролю** у покритій мікротитровій смужці, починаючи 1:30 -> 1:90 -> 1:270 -> 1:810.

Приклад: - Внесіть 25 мкл позитивного контролю від етапу 3 до лунки **1E** мікротитрової смужки.

- добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1F**

- добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1G**

- добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **1H**

- добре перемішайте та викиньте 50 мкл.
13. Зробіть 3-етапне розведення **кожного зразка** у покритій мікротитровій смужці, починаючи з 1:2 -> 1:6-> 1:18 ->1:54.
Приклад: - Внесіть 25 мкл позитивного контролю від етапу 3 до лунки **2А та/або 2Е** мікротитрової смужки.
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **2В і/або 2F**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **2С і/або 2G**
 - добре перемішайте та додайте 50 мкл до наступної лунки **2D і/або 2H**
 - добре перемішайте та викиньте 50 мкл.
Об'єднані зразки потрібно розвести; нерозведені -> 1:3 ->1:9 ->27.
 14. Внесіть 100 мкл контролю субстрату етапу 7 до останніх 2 лунок мікротитрової смужки.
 15. Щільно закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
 16. Промити планшет 5 разів відповідно до протоколу миття дивитися розділ 6.
 17. Внесіть 100 мкл розведеного антивидового антитіла, кон'югованого HRPO до усіх лунок.
 18. Щільно закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C.
 19. Промити планшет відповідно до протоколу миття дивитися розділ 6.
 20. Обережно змішайте рівні частини буферу А (біла кришка) та буферу В (синя кришка). **Готувати негайно перед використанням! Готувати тільки необхідну кількість. Субстрат можна використовувати тільки протягом 1 годин після змішування.**
 21. Внесіть 100 мкл розчину субстрату у кожну лунку.
 22. Інкубувати 10-13 хвилин у темряві (напр., накрити лунки листком паперу) при кімнатній температурі (21°C). Переконайтеся, що негативні не стають занадто темними.
 23. Додати 50 мкл стоп-розчину у кожну лунку; добре перемішати.
 24. Зчитайте значення абсорбції негайно (протягом 10 хвилин!) при 450 нм. Використовуючи 620 нм як зразок на ІФА зчитувачі. Використовуйте контроль субстрату в якості бланків.

12. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Поводитися з біологічним матеріалом як з таким, що передає інфекційні захворювання.
- Не піпетувати ротом.
- Не їсти, не пити, не курити, не готувати їжу, не користуватися косметикою на робочому місці.
- ТМВ субстрат (буфер В) є токсичним при вдиханні, при попаданні на шкіру або коли проковтнути; будьте обережні під час обробки субстрату.
- Не використовуйте компоненти, в яких закінчився термін придатності та не змішуйте компоненти з різних серійних лотів.
- Оптимальні результати можна отримати за умови чіткого дотримання протоколу. Обережне піпетування та промивання під час цієї процедури необхідні для підтримання точності та акуратності.
- Кожна лунка, зрештою, використовується як оптична кювета. Тому, не торкайтеся під поверхнею мікротитрового планшета та захищайте його від пошкодження та бруду.

13. ПЕРЕВІРКА ТЕСТУ

Якісна:

- Результати є дійсними, якщо дотримано наступних критеріїв:
 - o Середнє значення (СЗ) виміряного значення ОГ для Позитивного Контролю (ПК) повинно становити ≥ 1.000
 - o СЗ виміряного значення ОГ для Негативного Контролю (НК) повинно становити ≤ 0.150

У випадку недейсного аналізу, тестування потрібно повторити після ретельного перегляду інструкцій з використання.

Обчислення

Обчисліть середні значення (СЗ) вимірної ОГ для Негативного Контролю (НК) та Позитивного Контролю (ПК).

Співвідношення(S/P) зразка ОГ до середньої ОГ позитивного контролю обчислюється відповідно до наступного рівняння:

$$S/P = \frac{ОГ_{зразок} - СЗ_{ОГ_{НК}}}{СЗ_{ОГ_{ПК}} - СЗ_{ОГ_{НК}}}$$

Кількісна:

Для того, щоб підтвердити відповідні умови тесту ОГ позитивного контролю повинна становити $\geq 1,000$ ОГ одиниць (450 нм) та дати титр кінцевої точки ≥ 90 .

Негативний контроль повинен бути нижчим ніж 0.400 ОГ одиниць (450 нм) та давати титр кінцевої точки ≤ 30 .

14. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕСТУ

Цей тест можна використовувати 2 способами.

Кількісний: Позитивний-негативний











- Зразок зі співвідношенням S/P < 0,4 є негативним
 - o Специфічні антитіла до Brucella не можливо виявити.
- Зразок зі співвідношенням S/P $\geq 0,4$ є позитивним
 - o Специфічні антитіла до Brucella було виявлено.

Кількісний: Титр кінцевої точки

Титр ІФА можна обчислити за допомогою побудови кривої, використовуючи cut-off лінію (як приклад розведення молока 1:2 – 6 – 18 – 54 – 162 – 486 і т. д. взагалюму 8 розведень 3 етапів для сироватки 1:3 – 90 – 270 і т. д.) ОГ на осі Y і титр на осі X.

Титри ІФА можна обчислити, використовуючи значення ОГ як cut-off 2,5 рази негативного контролю при 1:30.

ВИКОРИСТАНІ СИМВОЛИ

Символ	
	Знак європейської відповідності
	Дивитися інструкції для використання*
	Медичний пристрій для діагностики <i>in vitro</i>
	Каталоговий номер*
	Номер партії*
	Містить достатньо для <n> тестів*
	Обмеження температури*
	Використати до*
	Виробник*
	Застереження*
RUO	Тільки для досліджень
VET	Тільки для досліджень
Розповсюджений	Розповсюджений
Вміст	Вміст
Об'єм/№:	Об'єм/№:



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

