



Antigen brucelic pentru Testul de fixare a complementului

Pourquier* CFT Brucellosis Ag
P00120-06

Test with confidence*

IDEXX



Testul de fixare a complementului pentru Antigenul Brucelic

De uz veterinar exclusiv

Denumire și utilizare

Pourquier* CFT Brucellosis Ag este Antigenul Brucelic al firmei IDEXX pentru diagnosticul brucelozei prin reacția de fixare a complementului.

Descriere și principiu

Pourquier* CFT Brucellosis Ag utilizează principiul tehnicii reacției de fixare a complementului. Antigenul pentru reacția de fixare a complementului este o suspensie concentrată de *Brucella abortus* (tulpina S99-Weybridge) inactivată prin încălzire și fenol. Reacția de fixare a complementului este una din cele mai sensibile metode de diagnostic a Brucelozei. Se utilizează o metodă de fixare la rece a tipului dezvoltat de Kolmer. Acest antigen permite diagnosticul serologic al brucelozelor (*Brucella melitensis*, *abortus*, *suis*). Acest antigen este standardizat să dea 50% fixare cu o diluție finală de 1:200 a serului standard internațional *Brucella abortus* (OIEISS).

Pourquier* CFT Brucellosis Ag a fost dezvoltat în concordanță cu standardul francez AFNOR U47-004 (detecția anticorpilor anti-bruceloze prin reacția de fixare a complementului, apr. 2009) și cu aplicarea regulamentelor OIE și Europene.

Reagenți

Păstrați toți reagenții protejați de lumină la 2-8°C. **Nu congelați.**

Reagenți

Reagenți	Volum
Antigen brucelic pentru reacția de fixare a complementului (concentrat)	100ml

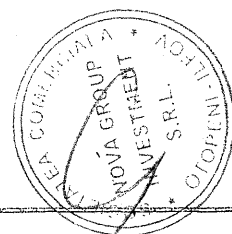
Notă : vezi tabelul de la pag.26 pentru descrierea simbolurilor internaționale utilizate pe etichetele setului.

Materiale necesare dar nefurnizate

- Tampon Veronal (disponibil de la IDEXX)
- Control pozitiv (disponibil de la IDEXX)
- Complement liofilizat
- Hematii de oaie la 50%
- Ser hemolitic standardizat
- Plăci pentru dispensarea reagenților și probelor
- Micropipete de precizie mono și multicanal (volumele reagenților listați în „Protocolul de testare” necesită pipete de precizie mai mică sau egală cu 5%)
- Vârfuri de pipete
- Incubator capabil să mențină temperatura de +37°C (± 3°C).
- Agitator de plăci
- Baie de apă

Precauții și avertismente pentru utilizatori

- Manipulați toate materialele biologice ca potențial infectate
- Nu pipetați cu gura
- Nu mâncați, nu beți sau fumați în locul în care manipulați reactivii





- Toate deșeurile trebuie decontaminate corespunzător înainte de eliminare. Eliminați conținutul conform legislației locale, regionale și naționale.
- Evitați contaminarea componentelor kitului
- Nu utilizați componentele după data lor de expirare
- Rezultate optime vor fi obținute prin respectarea strictă a acestui protocol. Pipetați cu grijă, cronometrați și spălați astfel încât să mențineți acuratețea și precizia.
- De uz veterinar exclusiv

Prepararea reagenților

Diluarea complementului

Reconstituiți complementul liofilizat cu solventul așa cum este indicat.
Diluati la 1:100 cu tampon Veronal.

Diluția tamponului Veronal

Tamponul Veronal trebuie diluat 1:5 cu apă distilată

Antigenul brucelic pentru Reacția de fixare a complementului

Antigenul brucelic concentrat trebuie diluat chiar înainte de utilizare în ser fiziologic (8,5g/l), sau mai bine cu tampon Veronal, conform cu factorul de concentrație indicat pe flaconul de antigen.

Titrarea complementului (în tuburi)

Pipetați complement reconstituit „C” diluat 1:100 (vezi mai jos), tamponul Veronal diluat („Vb”), antigenul brucelic diluat („Ag”) și cuplul hemolitic („Hc”), conform cu tabelul următor:

Tub ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	H0	H100
C(ml)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0	0,40
Vb(ml)	0,36	0,35	0,34	0,33	0,32	0,31	0,30	0,29	0,28	0,27	0,26	0,25	0,24	0,40	0
Ag(ml)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Agitați tuburile - puneți-le într-o baie de apă la 37°C (± 3°C) timp de 30 min. (±2min)															
Hc(ml)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Agitați tuburile - puneți-le într-o baie de apă la 37°C (± 3°C) timp de 30 min. (±2min)															

Hematii de ovine 2,5%

Amestecați 0,5ml hematii de oaie 50% cu 9,5ml tampon Veronal diluat.

Cuplul hemolitic

Titrarea complementului și testul de fixare a complementului trebuie neapărat realizate cu aceleași elemente ale cuplului hemolitic.

Preparați un volum suficient de produse pentru aceste 2 utilizări.

Păstrați-le separat între utilizări.

- Amestecați în proporții egale hematiile preparate la 2,5% (vezi mai sus) și serul hemolitic standard conținând 2UI/UICFT (diluat conform titrului indicat).
- Amestecați cantitățile necesare pentru fixarea complementului 20 minute (± 2 min) înainte de utilizare și lăsați-le la 18-26°C (vezi tabelul de mai jos pentru cantitățile necesare). Produsele rămase trebuie păstrate separat la 2-8°C până a doua zi.
- Scoateți tuburile din baia de apă și centrifugați-le imediat timp de 10 minute (± 2 min.) la 500-1000g.

Controlul hemolitic H50

Preparați controlul H50: amestecați 0,50ml supernatant din controlul hemolitic H0 cu 0,50ml supernatant din controlul hemolitic H100. Primul tub cu supernatant care prezintă aceeași culoare cu controlul H50 va fi numit unitatea H50.



Cantitatea de complement necesară pentru reacție:

Exemplu: numărul de godeuri=100

25μl complement diluat se pipetează în fiecare godeu:

25μl x 100=2,5ml (volumul total de complement ce trebuie preparat)

Unitatea H50 găsită pentru tubul nr.5 (80μl complement 1:100).

Testele utilizează 6 unități H50:

$$\frac{80 \times 6 \times 100 \times 25}{100 \times 200} = 60\mu\text{l complement trebuie diluat cu } 2440\text{ml tampon Veronal}$$

Prepararea probelor

Inactivați serurile de titrat într-o baie de apă la 59°C (±1°C) timp de 30 minute (±2min).

Diluati-le cu tampon Veronal diluat („Vb”) (în tuburi sau microplăci).

• **Diluția în tuburi**

Diluția	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Proba (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Vb (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500

• **Diluția în microplăci**

Diluția	TS	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Proba (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Vb (μl)	75	/	25	25	25	25	25	25	25

Se aruncă 25μl

Procedeeul de testare

Utilizați o pipetă pentru fiecare probă.

1. Pipetați probele diluate („S”), antigenul brucelic diluat („Ag”), complementul diluat („C”) și tamponul veronal („Vb”), conform următorului tabel :

• **Probele diluate în tuburi:**

Diluție	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	T Ag	T C'	T GR	TS
S(μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/	/	25
Ag (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/	/
C (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	25
Vb (μl)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	25	50	75	25

• **Probele diluate în microplăci:**

Diluție	TS	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	T Ag	T C'	T GR
S(μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/	/
Ag (μl)	/	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/
C (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/
Vb (μl)	25	/	/	/	/	/	/	/	/	25	50	75

2. Agitați plăcile folosind un agitator de plăci

3. Acoperiți plăcile

4. Incubați 16-20 de ore la 2-8°C

5. Puneți cuplul hemolitic (preparat cu o zi înainte – vezi prepararea reagenților) la 18-26°C timp de 10 minute (±2 min.)

6. În paralel:



- Puneți plăcile în incubator la $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) timp de 10 minute (± 2 min.) (una peste alta sau una lângă alta).
- b. Mențineți cuplul hemolitic la $18-26^{\circ}\text{C}$ pentru încă 10 minute (± 2 min.).

7. Adăugați 50 μl de cuplu hemolitic în fiecare godeu.
8. Agitați plăcile și apoi acoperiți-le.
9. Puneți plăcile în incubator la 37°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) timp de 30 minute (± 2 min.).
10. Centrifugați plăcile (500-1000g) la $2-8^{\circ}\text{C}$ timp de 10 minute (± 2 min.) sau lăsați-le la $2-8^{\circ}\text{C}$ timp de 60 minute (± 5 min.).
11. Evaluați supernatantul conform controalelor preparate după cum urmează:

	0	+	++	+++	++++
Tampon Veronal (μl)	0	25	50	75	100
Godeu hemoliză totală (μl) = Control complement	100	75	50	25	0

În fiecare godeu, rata de hemoliză a hematiilor sensibilizate se notează după cum urmează:

- +++++ = inhibarea totală a hemolizei
- ++++ = inhibare a hemolizei de 75% (=25% hemoliză)
- +++ = inhibare a hemolizei de 50% (=50% hemoliză)
- ++ = inhibare a hemolizei de 25% (=75% hemoliză)
- + = inhibare a hemolizei de 12.5% (=87.5% hemoliză)
- 0 = hemoliză completă

Interpretarea rezultatelor

- inhibare a hemolizei $< 50\%$ la $1/4$ = negativ
- inhibare a hemolizei $\geq 50\%$ la $1/4$ = pozitiv

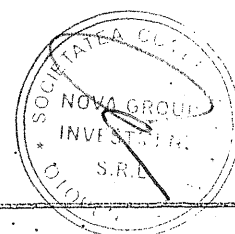
Correspondența dintre diluția serului și unitățile internaționale ale complementului fixat per mililitru (limita de pozitivitate = 20UI/ml(UICFT/ml)).

Diluția probei	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
UI (UICFT/ml)	10	20	40	80	160

Producător:
IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galera
34090 Montpellier, Franța

Pentru asistența tehnică:
Contactați managerul sau distribuitorul IDEXX apropiat
sau vizitați: www.idexx.com/production/contact
Suport tehnic IDEXX: 00-800-727-43399

*IDEXX și Test With Confidence sunt marcă înregistrată a IDEXX Laboratories, Inc., sau a afiliatelor sale din Statele Unite și/sau alte țări





POURQUIER*
RFC Ag Bruceloză

Agitați înainte de utilizare

REF P00120

100 ml

(1%)

2°C 8°C

LOT xxxx

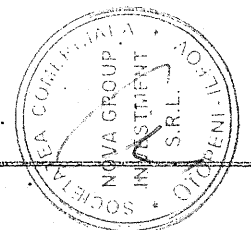
XX XXX X

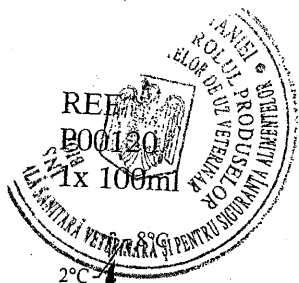


IDEXX Europa B.V, PO Box 1334, 2130, Hoofddorp, Olanda



IDEXX Montpellier SAS, 326 rue de la Galera, 34090 Montpellier, Franța





Pourquier*RFC Ag Bruceloză (1%)
Antigen brucelic pentru Testul de Fixare a Complementului

Agitați înainte de utilizare

LOT



IvD



IDEXX Europa B.V, PO Box 1334, 2130, Hoofddorp, Olanda



IDEXX Montpellier SAS, 326 rue de la Galéra, 34090 Montpellier, Franța

