



BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH

**surDx™ Bluetongue Virus (BTV) Antibodies cELISA
Test Kit Manual**

Catalog #: 10049-02 (192 godeuri); 10049-05 (480 godeuri)

Biostone Animal Health LLC. • 2019

CUPRINS

INFORMAȚII GENERALE	1
DESCRIEREA PRODUSULUI	1
REZUMATUL PROCEDURII	1
CONȚINUTUL KITULUI, DEPOZITAREA ȘI PERIOADA DE VALABILITATE	1
SPECIFICITATE (REACTIVITATE ÎNCRUCIȘATĂ)	2
MATERIALELE NECESARE CARE NU SUNT FURNIZATE ÎMPREUNĂ CU KITUL.....	2
AVERTISMENTE ȘI PRECAUȚII.....	2
PREGĂTIREA PROBEI	3
SER	3
PROTOCOLUL DE TESTARE	3
PREPARAREA REACTIVULUI.....	3
PROTOCOLUL ELISA.....	3
REZULTATE	4
INTERPRETAREA REZULTATELOR.....	4
GHID AL PROBLEMELOR.....	5
FĂRĂ CULOARE SAU REACȚIE A STANDARDDELOR.....	5
VALORI REDUSE ALE DENSITĂȚII OPTICE (OD) ÎN CITIREA CONTROLULUI POZITIV	5
VALORI CRESCUTE ALE DENSITĂȚII OPTICE (OD) ÎN CITIREA CONTROLULUI NEGATIV	5

Kitul de testare *AsurDx™ Bluetongue Virus (BTV) Antibodies cELISA Test Kit* este destinat doar pentru cercetarea de laborator. Cu excepția cazului în care se indică altfel, acest produs NU va fi utilizat pentru diagnosticul clinic.

Biostone Animal Health nu oferă niciun tip de garanție, expresă sau implicată, cu excepția faptului că materialele din care sunt fabricate produsele sale sunt de calitate standard. Nu există nicio garanție a comercializării acestui produs sau a competenței produsului folosit în orice scop. Biostone Animal Health nu este răspunzătoare pentru daune, inclusiv daune speciale, consecințe sau cheltuieli care rezultă direct sau indirect din utilizarea acestui produs.



INFORMAȚII GENERALE

Descrierea Produsului

Kitul *AsurDx™ Bluetongue Virus (BTV) Antibodies cELISA Test* este conceput pentru detecția anticorpilor specifici tuturor serotipurilor de virus bluetongue (BTV – virusul limbii albastre) în probele de ser de la bovine, caprine, ovine sau cerbi. Virusul bolii limbii albastre (BTV) este transmis de către musculițele *Culicoides imicola*, *Culicoides variipennis* și alte culicoide. Boala limbii albastre, cauzată de acest virus, este o boală virală a rumegătoarelor, transmisă de insecte și non-contagioasă. Speciile afectate sunt, în principal, ovinele, și, mai rar, bovinele, caprinele, cerbii, dromaderii și antilopele. La ovine, virusul bolii limbii albastre provoacă o boală acută cu morbiditate și mortalitate ridicată. Semnele majore ale acestei boli sunt febra ridicată, salivația excesivă, inflamația feței, a limbii și cianoza limbii. Din cauza limbii și a buzelor inflamate, aspectul fizic al animalului este modificat, limba modificându-și aparent culoarea în albastru. Totuși, acest semn este întâlnit la un număr mic al animalelor infectate.

Kitul detectează anticorpii împotriva proteinei BTV VP7 în serul de bovine, caprine, ovine sau cerbi. Acest test permite detectarea specială a tuturor serotipurilor BTV încă din 7-15 zile după infecție. Testul nu detectează anticorpi împotriva EHDV. Procedurile de testare durează mai puțin de 90 de minute și nu necesită o etapă de pre-diluare a probelor. *AsurDx™ Bluetongue Virus (BTV) Antibodies cELISA Test Kit* oferă o metodă ELISA de screening simplă, rapidă, sensibilă și specifică, bazată pe enzime.

Rezumatul Procedurii

Metoda se bazează pe metoda ELISA de blocare colorimetrică. Antigenul BTV VP7 a fost captușit în godeurile plăcii. În timpul analizei, se adaugă proba de ser și conjugatul anticorp monoclonal anti-BTV (mAb)-Biotin. Dacă în probă sunt prezenți anticorpi împotriva BTV, acesta va concura cu conjugatul anti-BTV mAb-Biotin pentru a se fixa de antigenul BTV VP7 captușit. După mai multe spălări, pentru a elimina substanțele nefixate, se adaugă conjugatul Streptavidin-HRP. Compusul anti-BTV mAb-Biotin - Streptavidin-HRP se va fixa de situsurile antigenice. După incubare, excesul de Streptavidin-HRP este eliminat printr-o a doua spălare și fixarea acestora este revelată cu ajutorul substratului TMB. În urma acestei incubării, porțiunea enzimatică a conjugatului, dacă este prezentă, reacționează cu substratul și se dezvoltă o culoare albastră. Reacția este apoi oprită (culoarea se schimbă de la albastru la galben) și se citesc densitățile optice. Intensitatea culorii permite determinarea stării probei testate. O probă puternic pozitivă va indica o reacție slabă (galben pal), în timp ce o probă negativă va indica o reacție puternică (galben închis). Toate nuanțele de galben între închis și pal reprezintă diferite grade de pozitivitate.

Conținutul kitului, depozitarea și durata de valabilitate

Din kitul *AsurDx™ Bluetongue Virus (BTV) Antibodies cELISA Test Kit* se pot testa 192 teste/controlare (Cat # 10049-02) sau 450 teste/controlare (Cat # 10049-05).

Reintroduceți toate microplăcile neutilizate în punga de folie și sigilați-le cu desicantul furnizat în ambalajul original.

Perioada de valabilitate este de 18 luni, respectându-se condițiile corespunzătoare de depozitare.

Conținutul kitului	Cat # 10049-02	Cat # 10049-05	Condiții de depozitare
Placă captușită cu antigen BTV VP7	2 x 96-godeuri pe placă	5 x 96-godeuri pe placă	2°- 8°C
BTV Control Pozitiv (cap roșu)	1.25 mL	2 X 1.25 mL	2°- 8°C*
BTV Control Negativ (cap alb)	1.25 mL	2 X 1.25 mL	2°- 8°C*
25X Anti-BTV mAb-Biotin Conjugat	0.75 mL	1.5 mL	2°-8°C*

Streptavidin-HRP Conjugat	24 mL	58 mL	2°-8°C*
BTV Diluent probă (culoare verde)	24 mL	58 mL	2°-8°C
20X Soluție de Spălare	56 mL	120 mL	2°-8°C
TMB Substrat	24 mL	58 mL	2°-8°C
Soluție de Stopare	24 mL	58 mL	2°-8°C

*****IMPORTANT***** Dacă nu intenționați să utilizați kitul pentru mai mult timp de o lună calendaristică, se recomandă depozitarea controalelor pozitive și negative, a conjugatului 25X Anti-BTV mAb-Biotin și a conjugatului Streptavidin-HRP la -20 ° C sau într-un congelator.

Specificitate (reactivitate încrucișată)

Kitul poate detecta anticorpi împotriva tuturor serotipurilor BTV în probele de ser provenite de la bovine, caprine, ovine sau cerbi și nu are reactivitate încrucișată cu probele de ser animal infectate cu EHDV.

Materialele necesare care nu sunt furnizate împreună cu kitul

- Cititor de plăci (450 nm)
- Mixer vortex
- Pipete de 10, 20, 100 și 1000 µL, pipetă multi-canal de 50-300 µL (opțional).
- Incubator 37°C
- Cronometru - temporizator.
- Apă deionizată sau distilată
- Vârfuri de pipetă (de culoare galbenă)
- Folie de aluminiu
- Pisetă, mașina manuală de spălat sau spălător de plăci automat
- Prosoape de hârtie.

Avertismente și precauții

- Biostone vă recomandă cu insistență să citiți următoarele avertismente și precauții pentru a vă asigura că aveți cunoștință de tehnicile ELISA și alte detalii cărora ar trebui să le acordați atenție deosebită când efectuați testul. Mai multe informații găsiți în secțiunea **Ghid al problemelor**. Periodic, se fac optimizări și revizuirii ale kitului și ale manualului. Prin urmare, este important să urmați protocolul furnizat împreună cu kitul.
- Nu utilizați kitul după ce perioada de valabilitate a fost depășită;
- Utilizați cele două controale, pozitiv și negativ, cu grijă;
- Nu utilizați reagenții de la alte kituri sau alte loturi. Reagenții și plăcile sunt specifice fiecărui lot sau kit;
- Mențineți o temperatură de laborator / cameră de 20 ° - 25 ° C (68 ° - 77 ° F). Evitați efectuarea testelor sub sau în apropierea orificiilor de ventilație, deoarece acest lucru poate provoca răcirea excesivă, încălzirea și / sau evaporarea. De asemenea, nu efectuați teste în lumina directă a soarelui, deoarece acest lucru poate provoca căldură excesivă și evaporare.
- Calitatea apei este foarte importantă; asigurați-vă că utilizați doar apă distilată sau deionizată;
- Când pipetați probele sau reactivii într-o placă goală, așezați vârful pipetei în colțul inferior al godeului, făcând contactul cu plasticul;
- Incubarea plăcilor de testare trebuie programată cât mai precis posibil;
- Adăugați mai întâi controalele și apoi probele;
- Plăcile trebuie păstrate întotdeauna în frigider (refrigerate) în saci sigilați cu desicant pentru a menține stabilitatea plăcii (plăcilor).
- Preveniți formarea condensului prin aducerea plăcilor la temperatura camerei în timpul ambalării.

Prepararea Probelor

Ser

Probele de ser sunt gata de utilizare pentru testul ELISA. Depozitați toate probele de ser neutilizate la -20°C .

Protocolul de testare

Prepararea reagentilor

IMPORTANT: Toți reactivii congelați trebuie aduși la temperatura camerei înainte de utilizare (1 - 2 ore la $20 - 25^{\circ}\text{C}$ / $68 - 77^{\circ}\text{F}$); Asigurați-vă că ați citit secțiunea "Avertismente și precauții" de la pagina 2. Soluțiile ar trebui să fie pregătite chiar înainte de efectuarea testului ELISA. Toți reactivii trebuie amestecați prin inversare înainte de utilizare. Nu puneți vârful de pipetă folosit sau reactivii utilizați înapoi în tuburile / sticlutele originale. Utilizați recipiente de unică folosință atunci când manipulați reactivii pentru a minimiza riscul de contaminare.

A. Pregătirea soluției de spălare 1X

Amestecați 1 volum de Soluție de Spălare 20X cu 19 volume de apă distilată.

A. Prepararea Conjugatului Anti-BTV mAb-Biotin 1X

Amestecați 1 volum Conjugat 25X Anti-BTV mAb-Biotin Conjugate cu 24 volume de BTV Diluant Probă.

Protocolul ELISA

Cantitatea de reactivi necesară pentru o singură reacție este prezentată în tabelul de mai jos.

Component	Volum per godeu
Pozitiv Control/Negativ Control	50 μL
Probă	20 μL
BTV Diluant Probă	30 μL
1X Anti-BTV mAb-Biotin Conjugat	50 μL
Streptavidin-HRP Conjugat	100 μL
1X Soluție de Spălare	2 mL
TMB Substrat	100 μL
Soluție de spălare	100 μL

Notă: Toate probele și controalele trebuie să fie efectuate în două exemplare

1. Aduceți Placa captușită cu antigen BTV VP7 și toate componentele kitului la temperatura camerei timp de cel puțin o oră.
2. Adăugați 50 μL din Controlul Negativ per godeu în două godeuri al plăcii căptușite cu antigen.
3. Adăugați 50 μL din Controlul Pozitiv per godeu în două godeuri al plăcii căptușite cu antigen.
4. Adăugați 30 μL din BTV Diluantul Probă în fiecare godeu, apoi adăugați 20 μL de probă de ser în fiecare godeu.
5. Adăugați 50 μL din Conjugatul 1X Anti-BTV mAb-Biotin în fiecare godeu.
6. Amestecați soluția în godeuri agitând ușor placa, manual, timp de 1 minut.

7. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de 30 de minute în incubator la 37 ° C.
8. Îndepărtați soluția din godeuri. Se spală placa prin adăugarea a **250 μL de Soluție de Spălare 1X** în fiecare godeu al plăcii. Se aruncă soluția de spălare și se usucă placa pe prosoape de hârtie. Repetați de încă patru ori pentru un total de cinci spălări.
Efectuați imediat următorul pas. Nu lăsați placa să se usuce.
9. Adăugați **100 μL din Conjugatul Streptavidin-HRP** în fiecare godeu al plăcii.
10. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de **30 de minute** în incubator la 37 ° C.
11. Spalați placa prin adăugarea a **250 μL de Soluție de Spălare 1X** în fiecare godeu al plăcii. Se aruncă soluția de spălare și se usucă placa pe prosoape de hârtie. Repetați de încă două ori pentru un total de trei spălări.
12. Adăugați **100 μL din Substratul TMB** în fiecare godeu al plăcii. 10. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de 15 minute la temperatura camerei.
13. Adăugați **100 μL din Soluția de Stopare** în fiecare godeu. Citiți placa, cât mai curând posibil, cu ajutorul unui cititor de plăci la o lungime de undă de **450 nm**.

Rezultatele

- A. Se măsoară **densitatea optică (DO)** a godeurilor la 450 nm în decurs de 15 minute după ce dezvoltarea culorii a fost oprită.
- B. Se calculează **densitatea optică medie** a Controlului Pozitiv (CP) și **media densității optice** a Controlului Negativ (CN).
- C. Se calculează **Procentul de Inhibiție (PI)** pentru toate probele după cum urmează:

$$\text{Procentul de inhibiție (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{DO}_{450} \text{ probă}}{\text{media DO}_{450} \text{ Control Negativ}} \right) \right] \times 100$$

Result Interpretation

- A. Media DO a controlului negativ trebuie să fie ≥ 0.5 ; Procentul de Inhibiție (%) al Controlului Pozitiv trebuie să fie $\geq 60\%$

Notă: Neîndeplinirea oricăruia dintre aceste criterii este un motiv pentru a renunța la rezultatele runde de testare.

- B. Pentru probele de bovine, caprine, ovine sau cerbi
 PI < 50% (negativ); Anticorpul BTM lipsesc din proba de testare.
 PI \geq 50% (pozitiv); Anticorpul BTM sunt prezenți în proba de testare..

Notă: Probele pozitive trebuie confirmate cu ajutorul unei a doua metode.

GHID AL PROBLEMELOR

I Nu se dezvoltă culoare sau reacție a standardelor

Cauze posibile	Recomandare
Reactivii au fost folosiți în ordine greșită sau s-a omis un pas.	Urmați protocolul cu atenție și repetați testul.
Anticorpul secundar a fost preparat incorect sau s-a deteriorat.	Toți anticorpii sunt specifici kitului și lotului. Asigurați-vă că anticorpul secundar și diluantul sunt amestecate în volume corecte.
Substratul TMB a fost deteriorat.	Utilizați un nou substrat TMB.

II Valori reduse ale densității optice (DO) în citirea Controlului Pozitiv

Cauze posibile	Recomandare
Reagenți expirați sau aparținând unui lot diferit	Verificați data expirării și numărul lotului.
Soluția de spălare fost preparată incorect.	Utilizați soluția de spălare din kit și asigurați-vă că a fost preparată corect.
Au fost folosite prea multe cicluri de spălare	Aplicați numărul de cicluri de spălare prevăzute în kit
Timpul de incubare a fost prea scurt	Cronometrați fiecare placă separat pentru a vă asigura că respectați timpul de incubare, urmăriți protocolul de lucru.
Temperatura din laborator a fost prea scăzută	Mențineți temperatura din laborator între 20-25°C. Nu efectuați testul în apropierea instalației de aer condiționat sau lângă ferestre reci.
Reagenții și plăcile au fost prea reci	Asigurați-vă că reagenții au atins temperatura camerei. Scoateți reagenții din cutie și țineți-i la temperatura camerei cu cel puțin o ora înainte de lucru
S-a citit la o lungime de undă greșită sau cititorul este defect	Asigurați-vă că se citește la lungime de undă de 450 nm și citiți placa încă o dată. Verificați calibrarea aparatului și alinierea filtrelor.
Kitul a fost supus unui stres excesiv.	Verificați de câte ori a fost scos kitul din frigider. Verificați dacă kitul a stat la temperaturi extreme un timp prea îndelungat.
Placa/plăcile de lucru a/au fost compromise.	Puneți placa la frigider doar în punga sigilată împreună cu desicantul pentru menținerea stabilității. Pentru a preveni formarea condensului, lăsați placa să ajungă la temperatura camerei în ambalajul său, sigilată.

III Valori crescute ale densității optice (DO) în citirea Controlului Negativ

Cauze posibile	Recomandare
Soluția de spălare a fost diluată în apă de slabă calitate	Dacă calitatea apei este discutabilă, înlocuiți sursa de apă distilată
Soluția substrat s-a deteriorat	Substratul trebuie să fie incolor înainte de aplicare
Spălarea a fost insuficientă sau spălătorul are performanțe reduse	Aplicați numărul de cicluri de spălare prevăzuți în instrucțiuni. Asigurați-vă că fiecare godeu este spălat cu cel puțin 250 μl soluție de spălare. Verificați funcționarea corectă a spălătorului, dacă curge sau dacă aspirarea este corectă.
Cititorul nu funcționează corespunzător sau nu face blanc. Aceasta se întâmplă atunci când culoarea este slabă dar apar valori OD mari	Verificați funcționarea cititorului cu ajutorul plăcii de calibrare, verificați alinierea filtrelor. Verificați modul de efectuare al blanșului și face blanc din nou dacă este posibil.
Temperatura din laborator este prea mare	Mențineți temperatura din laborator între 20-25°C. Nu efectuați testul în apropierea surselor de căldură sau în lumina solară directă.
Reagenții au fost amestecați, contaminați sau preparați incorect	Asigurați-vă că se folosesc reagenți corespunzători și că soluțiile au fost preparate corect și nu există contaminare.



BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH

Biostone Animal Health LLC
2860 Exchange Blvd. suite 160
Southlake, TX 76092 USA
Tel: (817)329-0500
Fax: (817) 329-0501

Creat și produs în USA
info@biostoneah.com
www.biostoneah.com

Appendix 1 / Anexa 1

Labels / Etichete producător și traducere

Etichetă exterioară kit și traducere

**AsurDx™ Bluetongue Virus (BTV)
Antibodies cELISA Test Kit
Cat. No.: 10049-05 (5 x 96 wells)**



**BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH**

STORAGE: 2°-8° C

**Batch no.: BY7620
Exp.: 31-January-2022**

Biostone Animal Health LLC

**AsurDx™ Bluetongue Virus (BTV)
Antibodies cELISA Test Kit
Cat. No.: 10049-05 (5 x 96 godeuri)**



**BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH**

A SE DEPOZITA: 2°-8

**Lot nr.: BY7620
Dată expirare.: 31-ianuarie-2022**

Biostone Animal Health LLC

Appendix 1 / Anexa 1

Labels / Etichete producător și traducere

Etichete componente kit producător



AsurDx™
BTV VP7
Antigen-coated plate
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Antigen-coated plate
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Antigen-coated plate
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Antigen-coated plate
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Antigen-coated plate
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV
Assay Diluent
Lot: BY7615 Exp: 31-Jan-2022



AsurDx™
BTV
Streptavidin-HRP Conjugate
Lot: BY7619 Exp: 31-Jan-2022



AsurDx™
20x
Wash Solution
Lot: W072 Exp: 30-Sep-2022



AsurDx™
TMB Substrate
Lot: T0815 Exp: 30-Sep-2022



AsurDx™
Stop Solution
Lot: S0612 Exp: 30-Sep-2022

Traducere



AsurDx™
BTV VP7
Placă căptușită cu antigen
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Placă căptușită cu antigen
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Placă căptușită cu antigen
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Placă căptușită cu antigen
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV VP7
Placă căptușită cu antigen
Lot: BY4925 Exp: 31-Jul-2022



AsurDx™
BTV
Diluent probă
Lot: BY7615 Exp: 31-Jan-2022



AsurDx™
BTV
Streptavidin-HRP Conjugat
Lot: BY7619 Exp: 31-Jan-2022



AsurDx™
20x
Soluție de spălare
Lot: W072 Exp: 30-Sep-2022



AsurDx™
TMB Substrat
Lot: T0815 Exp: 30-Sep-2022



AsurDx™
Soluție de stopare
Lot: S0612 Exp: 30-Sep-2022

Appendix 1 / Anexa 1

Labels / Etichete producător și traducere

Etichete componente kit producător



**AsurDx™
BTB
Negative Control**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB
Negative Control**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB
Positive Control**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB
Positive Control**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB**
25X Anti-BTB mAB-Biotin Conjugate
Lot: BY7614 Exp: 31-Jul-2022

Traducere



**AsurDx™
BTB
Control Negativ**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB
Control Negativ**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB
Control Pozitiv**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB
Control Pozitiv**
Lot: BY7613 Exp: 31-Jul-2022



**AsurDx™
BTB**
25X Anti-BTB mAB-Biotin Conjugat
Lot: BY7614 Exp: 31-Jul-2022