



Kit BioPro Rabies ELISA Ab

Test ELISA de blocare pentru detectarea anticorpilor virusului rabic în ser, plasmă sau lichide corporale

192 de reacții

Cat. Nr. : RAB01-02
Versiune: Rabies 1.1e

Instrucțiuni de utilizare.

Producător



OK SERVIS BioPro, sro

Boreticka 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horni Pocernice, Republica Cehă
tel. : +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@rabieselisa.com
<http://www.rabieselisa.com>





INTRODUCERE

Rabia este o boală virală fatală care apare la oameni și animale. Boala este cauzată de virusul rabiei foarte neurotrop. Virusul se transmite în mare parte prin contact apropiat cu saliva infectată a animalelor infectate cu rabie prin mușcături sau zgârieturi și apoi pe calea neuronală către SNC, provocând encefalopatie și, în final, moarte.

Cele mai multe animale infectate sunt carnivorele domestice și sălbatice. Pentru eradicarea rabiei în carnivorele sălbatice se utilizează imunizarea orală în multe țări. Estimarea seroprevalenței la populația vaccinată este una dintre metodele de evaluare a eficacității imunizării orale.

Kitul ELISA Rabies a fost dezvoltat pentru detectarea anticorpilor împotriva rabiei la carnivorele domestice și sălbatice și a fost validat cu probe de ser de la vulpe și câine. Vă recomandăm să utilizați acest test ELISA pentru detectarea anticorpilor împotriva rabiei la vulpi. Această metodă este rapidă și simplă și, în comparație cu metodele „standard de aur”, cum ar fi FAVN sau RFFIT, este mai convenabilă, deoarece, de multe ori, calitatea probelor de ser de vulpe poate fi scăzută prin contaminarea bacteriană, autoliza sau testarea fluidelor corporale.

PRINCIPIUL TESTULUI

Godeurile de microplăci sunt tapetate cu antigen rabic. Probele diluate sunt incubate în godeuri. După spălare, se adaugă în godeuri anticorp anti-rabie biotinitat. Dacă proba investigată conține anticorpi anti-rabie specifici, aceștia blochează legarea anticorpilor anti-rabie biotinitați cu antigen rabic tapetat. Dacă proba investigată nu conține anticorpi specifici anti-rabie, anticorpii anti-rabie biotinitați formează un complex antigen - anticorp biotinitat. După spălare, în godeuri se adaugă conjugat de Streptavidină peroxidază. Streptavidina peroxidaza se va lega de complexul antigen - anticorp biotinitat. După o altă etapă de spălare, soluția de substrat (TMB) este adăugată în godeuri, formând compusul albastru care devine galben după inhibarea reacției. Intensitatea culorii este citită la 450 nm, iar scăderea intensității în comparație cu controlul negativ este proporțională cu cantitatea de anticorpi blocați din proba investigată.

REACTIVI

Kitul trebuie păstrat într-un loc uscat și întunecat, la 2 - 8°C.

Microplăci tapetate cu virus rabic	2 plăci x benzi de 96 de godeuri
▪ Ser de control pozitiv la virus rabic	1 flacon (0,6 ml), capac roșu
▪ Ser negativ de control	1 flacon (0,6 ml), capac albastru
▪ Ser de control la virus rabic 1	1 flacon (0,3 ml), capac negru
▪ Ser de control la virus rabic 2	1 flacon (0,3 ml), capac alb
▪ Ser de control la virus rabic 3	1 flacon (0,3 ml), capac transparent
▪ Diluant probă (gata de utilizare)	1 sticlă (15 ml)
▪ Diluant pentru anticorp biotinitat (gata de utilizare)	1 sticlă (30 ml)
▪ Anticorp anti-rabie biotinitat (100x concentrat)	1 flacon (0,3 ml), capac galben
▪ Diluant pentru conjugat de Streptavidină peroxidază (gata de utilizare)	1 sticlă (30 ml)
▪ Conjugat de Streptavidină peroxidază (100x concentrat)	1 flacon (0,3 ml), capac verde
▪ Substrat TMB (gata de utilizare)	1 sticlă (30 ml)
▪ Soluție de stopare; 0,5M H ₂ SO ₄ (gata de folosire)	1 sticlă (15 ml)
▪ Soluție de spălare (10x concentrată)	1 sticlă (250 ml)
▪ Folii adezive	6 folii

MATERIAL NECESAR DAR CARE NU ESTE INCLUS ÎN KIT

- Micropipete de precizie și micropipete multicanal pentru volum de la 10 la 1000 μl
- Vârfuri de unică folosință pentru pipetă 10-1000 μl
- Sistem de spălare manual sau automat de microplăci
- Cititor de microplăci, filtru 450 nm
- Vortex, agitator orbital
- Incubator (37 °C)
- Flacon gradat (50-1000 ml)
- Tuburi de centrifugare
- Apă distilată sau deionizată

PRECAUȚII PENTRU UTILIZARE

- Păstrați toți reactivii la 2 - 8°C.
- Toți reactivii kitului trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei (18 - 25°C) înainte de utilizare, cu excepția anticorpului biotinitat și a conjugatului de Streptavidină peroxidază.
- Luați în considerare orice material care intră direct în contact cu probele și reactivii ca fiind material potențial infecțios.
- Evitați contactul substratului TMB cu pielea, membranele mucoase și cu ochii.
- Purtați mănuși de unică folosință atunci când manipulați probe și reactivi.
- Nu pipetați cu gura.



- Utilizați noi vârfuri de unică folosință pentru fiecare probă investigată.
- Nu utilizați reactivi după data de expirare a acestora și nu amestecați reactivi din loturi diferite.
- Soluția de stopare conține acid (0,5M H₂SO₄), care poate provoca arsuri grave. În caz de contact cu pielea și ochii, spălați imediat cu multă apă și consultați un medic.
- Pentru prepararea soluției de spălare trebuie utilizată apă distilată sau deionizată de bună calitate.
- Evitați formarea de spumă și bule prin pipetare și spălare atentă.
- În timpul procedurii de test, placa nu trebuie să se usuce niciodată. Dacă procedura de testare este întreruptă din orice motiv, lăsați godeurile plăcii umplute cu soluție de spălare.
- Protejați substratul TMB de lumină directă și agenți oxidanți. Utilizați numai sticlă sau plastic curat de laborator cu suport TMB. Nu utilizați substrat TMB de culoare albastră înainte de a fi distribuit în godeuri.
- Înainte de a arunca toate materialele și produsele de unică folosință folosite, acestea trebuie decontaminate fie prin imersiune timp de cel puțin 1 oră în hipoclorură de sodiu proaspăt preparată 5%, fie prin autoclavare la 121°C timp de minim 30±1 minute.

PREPARAREA REACTIVILOR

Pregătirea microplăcilor

Microplăcile trebuie lăsate să ajungă la temperatura camerei (18-25°C) înainte de utilizare. Fâșiile neutilizate deschise pot fi depozitate într-o pungă de plastic închisă cu sac desicant la 2 - 8°C în condiții de întuneric, timp de cel mult o lună.

Soluție de spălare

Soluția de spălare concentrată (10x) trebuie adusă la temperatura camerei înainte de utilizare. Aceasta poate forma cristale la 2 - 8°C, care vor dispărea la temperatura camerei (18 - 25°C). Dacă nu dispar, soluția trebuie lăsată la temperatura camerei mai mult timp, sau este posibilă încălzirea soluției la 37±2°C și agitați ușor până când toate cristalele vor fi dizolvate.

Pentru a prepara soluția de spălare amestecați 1 volum de soluție de spălare concentrată (10x) cu 9 volume de apă distilată sau deionizată (de exemplu, 50 ml de soluție de spălare concentrată (10x) adăugați la 450 ml de apă distilată sau deionizată).

Anticorp anti-rabie biotinitat

Se diluează anticorpul anti-rabie biotinitat concentrat la 1/100 în Diluant pentru anticorp biotinitat. (de exemplu, cantitatea necesară pentru o placă este reprezentată cu un amestec de 110 μl anticorp biotinitat concentrat anti-rabie și 11 ml Diluant pentru anticorp biotinitat).

Înainte de pregătirea diluției de lucru, anticorpul anti-rabie biotinitat concentrat trebuie să fie amestecat la vortex.

Diluția de lucru pregătită a anticorpului trebuie utilizată în decurs de 8 ore!

Conjugat de Streptavidină peroxidază

Se diluează conjugatul de Streptavidină peroxidază concentrat la 1/100 în diluant pentru conjugatul de Streptavidină peroxidază (de exemplu, cantitatea necesară pentru o placă este reprezentată cu un amestec de 110 μl concentrat biotinitat de Streptavidină peroxidază conjugat și 11 ml Diluant pentru conjugatul de Streptavidină peroxidază).

Înainte de pregătirea diluției de lucru, conjugatul concentrat de Streptavidină peroxidază trebuie amestecat în vortex.

Diluția de lucru pregătită a conjugatului Streptavidină peroxidază trebuie utilizată în decurs de 8 ore!

PREPARAREA PROBELOR

Probele de ser investigate trebuie diluate la 1/2 în diluant pentru probă (de ex. 60μl + 60μl) într-o placă dummy sau în microtuburi. Serul de control pozitiv, serul de control negativ și serul de control trebuie diluate în același mod ca probele de ser.

Observație:

1. Ca o placă dummy, poate fi utilizată orice microplacă cu un nivel scăzut de legare a proteinelor.
2. De asemenea, este posibil să se dilueze controale și probe de ser direct în placă. Se distribuie 50 μl de diluant pentru probă pe godeu și apoi se distribuie 50 μl de ser de control pozitiv, ser de control negativ și ser de control în godeuri adecvate. Apoi se distribuie 50μl de probe de ser în godeurile rămase.

PROCEDURA DE TESTARE

1. Incubația serurilor investigate și de control

Notă: Toate serurile de control trebuie amestecate la vortex înainte de distribuire.

- 1.1 Se distribuie 100μl de ser de control pozitiv diluat în godeurile A1 și B1.
- 1.2 Se distribuie 100μl de ser de control negativ diluat în godeurile A2 și B2.
- 1.3 Se distribuie 100μl de ser de control diluat 1 la godeul C1.
- 1.4 Se distribuie 100μl de ser de control diluat 2 la godeul D1.
- 1.5 Se distribuie 100μl de ser de control diluat 3 la godeul E1.
- 1.6 Se distribuie 100μl de probe de ser diluate în godeurile rămase.
- 1.7 Acoperiți placa cu folie adezivă și incubați peste noapte (18 - 24 ore) la 2 - 8°C scuturând ușor pe agitatorul orbital.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	NC	10									
B	PC	NC	11									
C	CS1	4	12									
D	CS2	5	13									
E	CS3	6	...									
F	1	7										
G	2	8										
H	3	9										

INTERPRETARE:

Calculați procentul de blocare (PB) pentru fiecare probă:

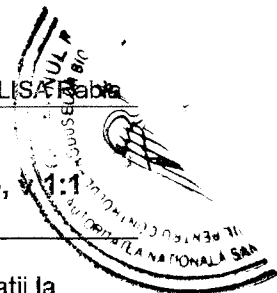
$$PB\% = \frac{OD_{NC} - OD_{probă}}{OD_{NC} - OD_{PC}} \times 100$$

- Proba de ser cu PB mai mic de 40 % este considerată ca fiind negativă pentru anticorpii rabiei.
- Proba de ser cu PB egal sau mai mare de 40% este considerată pozitivă pentru anticorpii rabiei.
- Proba de ser cu PB egal sau mai mare de 70% este considerată ca o probă de ser cu un nivel de anticorpi egal sau mai mare de 0,5 UI/ ml pe baza testului FAVN.

Notă: În scopul evaluării eficacității imunizării orale, vă recomandăm să utilizați prima întrerupere pozitivă (PB egal sau mai mare de 40%). Utilizarea celui de-al doilea punct pozitiv (PB egal sau mai mare de 70%) pentru interpretarea rezultatelor cu seruri de vulpe nu este recomandată deoarece cele mai multe probe de ser de vulpe sunt de fapt lichide corporale cu factor de diluție necunoscut, ceea ce face aproape imposibil de cuantificat exact nivelul de protecție.

SCHEMA PROCEDURII DE TESTARE

1. Se diluează serurile de control și probele de ser.
 - 1.1 Se distribuie 100μl de ser de control pozitiv diluat în godeurile A1 și B1.
 - 1.2 Se distribuie 100μl de ser de control negativ diluat în godeurile A2 și B2.
 - 1.3 Se distribuie 100μl de panou diluat de ser de control în godeurile A3-A5.
 - 1.4 Se distribuie 100μl de probe de ser diluate în godeurile rămase.
 - 1.5 Se incubează peste noapte la 2 - 8 °C, se agită ușor.
2. Se pregătește anticorpul anti-rabie biotinitat.
 - 2.1 Se spală plăcile de 6 ori.
 - 2.2 Se distribuie 100μl de anticorp anti-rabie biotinitat diluat la 1/100 în toate godeurile.
 - 2.3 Se incubează timp de 30 de minute la 37± 2°C, se agită ușor.
3. Se prepară conjugatul de Streptavidină peroxidază.
 - 3.1 Se spală plăcile de 4 ori.
 - 3.2 Se distribuie 100μl de conjugat de Streptavidină peroxidază diluat la 1/100 în toate godeurile.
 - 3.3 Se incubează timp de 30 de minute la 37± 2°C, se agită ușor.
- 4.1 Se spală plăcile de 4 ori.
- 4.2 Se distribuie 100 μl de substrat TMB în toate godeurile.
- 4.3 Se incubează timp de 15-30 minute la temperatura camerei (18 - 25°C), se agită ușor.
- 5.1 Se stopează reacția cu 50 μl de soluție de stopare.
- 6.1 Se citește absorbanta (DO) la 450 nm.
- 7.1 Criterii de validare
- 7.2 Interpretarea rezultatului



ANEXA 1 la kitul ELISA Ab BioPro Rabies - Instrucțiuni de utilizare,
 Data: 10.12.2013

Pe baza datelor introduse de utilizatori, am decis să adăugăm următoarele informații la Instrucțiunile pentru utilizarea kitului nostru BioPro Rabies ELISA Ab:

1. VOLUM INSUFICIENT AL PROBEI

Dacă nu există suficiente seruri (mai puțin de 50 μ l), diluați o astfel de probă de ser cu PBS pentru a obține un volum de probă de 50 μ l (de exemplu, dacă aveți 30 μ l de ser, adăugați 20 μ l de PBS). Marcați o astfel de probă ca diluată și urmați procedura standard de testare, pasul 1.

2. OBTINEREA PROBEI DINTR-UN CHEAG DE SÂNGE

Alternativ, proba poate fi obținută dintr-un cheag de sânge, urmând următoarea procedură:

2.1. Cheag de sânge proaspăt

- Tăiați **cheagul de sânge proaspăt** (obținut din inimă sau din vasele de sânge majore) și transferați-l într-un tub de 10-12 ml.
- Închideți tubul și lăsați-l la temperatura camerei (18-25°C) sau în incubator încălzit la $37\pm 2^\circ\text{C}$ timp de 23 de ore.
- Se transferă la frigider (4-8°C) timp de 12 ore \pm 30 minute (peste noapte).
- Centrifugați partea lichidă din cheag de sânge la 5-10.000 rpm, timp de 15 ± 10 minute, iar apoi testați lichidul obținut sub formă de ser urmând procedura standard, pasul 1.

2.2. Cheag de sânge uscat

- Tăiați **cheagul de sânge uscat**, puneți-l într-un tub de 10-12 ml, adăugați PBS cu antibiotice (PNC G 100000 U/l, STM 100mg/l, NEO 50 mg/l) maxim în raport 1:1, marcați ca probă diluată și urmați conform punctului 2.1. din această anexă.

ANEXA 2) la kitul ELISA Ab BioPro Rabies - Instrucțiuni de utilizare, v 1.1

Data: 31.1.2018

Modificarea protocolului de testare pentru probele de la lilieci se bazează pe faptul că există o problemă de a obține o cantitate suficientă de probă de la un singur liliac. Modificarea protocolului se bazează pe cea mai bună cunoaștere a testului și cu scopul de a păstra cea mai bună specificitate și sensibilitate posibilă.

REACTIVI

Acordați atenție la consumul crescut al soluției de diluant pentru probă cu acest protocol de testare și, prin urmare, comandați o sticlă suplimentară (per kit) de diluant de probă (1 sticlă de 15ml)

PREPARAREA PROBELOR

(Acest capitol înlocuiește capitolul original din manualul inclus (instrucțiuni de utilizare))
(numai!) probele de ser investigate trebuie diluate până la **1/10** în diluantul pentru probă (de exemplu, **15μl + 135μl Diluant pentru probă**) într-o placă fictivă sau în microtuburi.

Important!! Serul de control pozitiv (PC), serul de control negativ (NC) și serurile de control (CS1, CS2, CS3) sunt diluate conform protocolului standard pentru **1/2** în diluant pentru probă (de ex **60μl + 60μl Diluant pentru probă**) într-o placă fictivă sau în microtuburi.

Observație:

3. Ca o placă fictivă poate fi utilizată orice microplacă cu un nivel scăzut de legare a proteinelor.
4. De asemenea, este posibil să se dilueze controalele sau probele de ser direct în placă.
 - a, Pentru **controale** se distribuie 50μl de diluant pentru probă pe godeu și apoi Se distribuie 50 μl de ser de control pozitiv, ser de control negativ și ser de control în godeuri adecvate.
 - b, Pentru **seruri** se distribuie 90μl de diluant pentru probă per godeu și apoi se distribuie 10 μl de probe de ser către godeurile rămase.

INTERPRETARE :

(Acest capitol înlocuiește capitolul original din manualul inclus (instrucțiuni de utilizare))

Calculați procentul de blocare (PB) pentru fiecare probă:

$$PB\% = \frac{OD_{NC} - OD_{probă}}{OD_{NC} - OD_{PC}} \times 100$$

- Proba de ser cu **PB mai mic de 30 %** este considerată ca fiind negativă pentru anticorpii anti virus rabic.
- Proba de ser cu **PB egal sau mai mare de 30%** este considerată pozitivă pentru anticorpii anti virus rabic.

Contact

O.K. SERVIS
BioPro
OK SERVIS BioPro, sro

Boreticka 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horni Pocernice, Republica Cehă
tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@rabieselisa.com
<http://www.rabieselisa.com>

BioPro Rabies ELISA Ab kit

O.K. SERVIS
io ro

WWW.RABIESELISA.COM

Test ELISA de blocare pentru detectarea anticorpilor împotriva virusului rabic din ser sau plasma

Conținutul kitului:

REF Cod produs: **RAB 01-02**



Doar utilizare in vitro



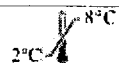
Citiți prospectul înainte de utilizare



LOT: Rxxxx



Expiră la: xxxx-xx-xx



A se păstra la 2-8°C



O.K.Servis BioPro, s.r.o

Boretika 2662/1, 193 00 Praga 9, Republica Cehă

Tel: +420 281 091 460 • Fax: +420 281 866 264

E-mail: info@rabielisa.com • www.rabielisa.com

Cant.

2 x 1
1 x 0,6ml
1 x 0,6ml
1 x 0,3ml
1 x 0,3ml
1 x 0,3ml
1 x 15ml
1 x 30ml
1 x 0,3ml
1 x 30ml
1 x 0,3ml
1 x 30ml
1 x 15ml
1 x 250ml
6 x 1

Descriere

Plăci căptușite cu antigen rabie
Ser control pozitiv
Ser control negativ
Ser control 1
Ser control 2
Ser control 3
Diluant pentru probe
Diluant pentru anticorpi biotinilați
Anticorpi biotinilați anti-rabie, 100x
Diluant pentru conjugat streptavidin
Conjugat streptavidin cuplat cu peroxidază, 100x
Substrat TMB
Soluție de stopare, H₂SO₄ 0,5M
Soluție de spălare, concentrata 10x
Folii adezive