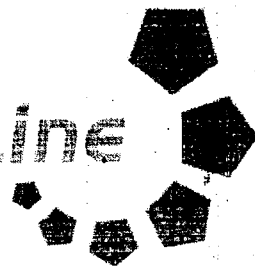




TestLine
Clinical
Diagnostics




EBLV Ab ELISA

Nr. Cat. EBL480



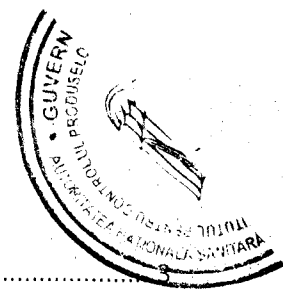
480

GMP

 TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
Křižkova 68, 612 00 Brno, CZ
Tel: +420 541 248 311
FAX: +420 541 243 390
E-mail: info@testlinecd.com
www.testlinecd.cz
www.testlinecd.com



Veterinary Research Institute
Hudecova 70, 621 32 Brno, CZ
Tel: +420 533 331 111
FAX: +420 541 211 229
E-mail: podatelna@vri.cz
www.vri.cz



Cuprins

1. Introducere.....	
2. Principiul testării	3
3. Materiale furnizate.....	3
4. Alte materiale necesare pentru efectuarea analizei	4
5. Depozitare și stabilitate	4
6. Prepararea reactivilor.....	4
7. Prepararea probelor și a Serurilor de Control	5
9. Protocol de testare.....	6
10. Controlul calității	6
11. Calcularea și interpretarea rezultatelor	Error! Bookmark not defined.
12. Măsuri de siguranță	7
13. Observatii referitoare la procedura	Error! Bookmark not defined.
14. Simboluri Instrucțiuni de utilizare.....	9



Imunoanaliză enzimatică pentru detectarea anticorpilor împotriva virusului leucemic bovin în probe de ser de sânge bovin individuale și comasate

1. Introducere

Virusul Leucozei Enzootice Bovine (EBLV) face parte din familia *Retroviridae*. Leucoza Enzootică Bovină (EBL) este o boală infecțioasă a bovinelor. Virusul infectează în primul rând limfocitele B și determină o reacție persistentă a anticorpilor împotriva a cinci proteine virale. Cel mai puternic răspuns detectat al anticorpilor este fata de glicoproteina de suprafață gp-51 și proteina internă p-24. Numai aproximativ 11% din animalele infectate dezvoltă simptome de limfocitoză și limfosarcomatoză persistentă.

Tehnicile de diagnostic curente sunt bazate pe detectarea de anticorpi specifici. Metodele utilizate în mod obișnuit sunt testul de precipitare în gel de agar (AGPT) pentru a determina anticorpii din ser, ELISA sau RIA. Ca urmare a sensibilității și specificității ridicate, ELISA este utilizat pentru detectarea anticorpilor antivirali în serurile evaluate ca fiind negative prin AGPT. Această tehnică îndeplinește cerințele pentru testarea probelor comasate din aceste materiale cu o sensibilitate corespunzătoare cerințelor O.I.E (Directiva UE 88/406). Kitul este standardizat conform standardelor internaționale, inclusiv E05. Kitul detectează serul standard O.I.E. denumit E05 în diluție 1:100, permițând examinarea a zece probe grupate (pooled).

2. Principiul testării

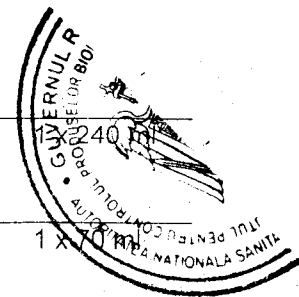
Kitul este destinat pentru detectarea anticorpilor specifici dintr-o probă cu ajutorul unei metode EIA de tip sandwich (ex. fază solidă acoperită cu un antigen specific – anticorp din proba analizată – anticorp marcat). Anticorpul marcat (conjugat) este o fracție de imunoglobulină animală față de imunoglobulina bovină conjugată cu peroxidază de hrean. Activitatea peroxidazei este determinată în test printr-un substrat ce conține TMB. Pozitivitatea este indicată atunci când apare culoarea albastră; după adăugarea soluției de stopare, culoarea albastră devine galbenă. Intensitatea culorii galbene este măsurată cu ajutorul unui fotometru la 450 nm și este proporțională cu concentrația anticorpilor specifici din probă.

Antigenul utilizat

Antigen BLV purificat și activat ce conține p-24 (proteină internă)

3. Materiale furnizate

MICROPLATE	Placă Microtitrare acoperită cu antigen, 12x8 godeuri în ambalaj cu desicant	5 bucati
NCS	Ser Control Negativ ser bovin concentrat 10x, fără anticorpi specifici	1 x 0,4 ml
PCS-L	Ser Control Pozitiv - limită ser bovin concentrat 10x, cu anticorpi specifici	1 x 0,4 ml
CONJUGATE	Conjugat anticorpi anti- IgG bovină marcați cu peroxidază, concentrație 100x	1 x 0,8 ml



DILUENT 13	Diluant pentru Probă 13 Tampon cu stabilizatori de proteina, gata de utilizare	
CONJ.DILUENT 11	Diluant pentru Conjugat 11 Tampon cu stabilizatori de conjugat, gata de utilizare	1 x
SUBSTRATE 5	TMB-Complete 5 Soluție de substrat cromogen, ce conține TMB/H ₂ O ₂ , gata de utilizare	1 x 60 ml
WASH 20x	Soluție de Spălare tampon concentrat 20x	2 x 60 ml
STOP	Soluție de Stopare Soluție acid, gata de utilizare	1 x 60 ml
	Instrucțiuni de utilizare	1

4. Alte materiale necesare pentru efectuarea analizei

Pipete monocanal și multicanal
 Vârfuri de unică folosință
 Spălător microplacă
 Cronometru
 Agitator microplacă (nu este necesar la testarea unui număr mai mic de probe)
 Incubator (37°C) cu control de umiditate
 Cititor microplăci

5. Depozitare și stabilitate

Depozitați kitul la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C. Depozitat astfel, data de expirare indicată pe etichetă este validă (kitul este valabil timp de 24 de luni de la data fabricației). După deschidere kitul va fi utilizat în termen de trei luni.

Prepararea și depozitarea probelor

Pentru testare se utilizează probe de ser. Probele pot fi depozitate la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C timp de 48 de ore. În cazul depozitării prelungite, temperatura de depozitare va fi de -20 °C.

6. Prepararea reactivilor

Diluati Soluția de Spălare 1:20, ex. 60 ml de Soluție de Spălare concentrată + 1140 ml de apă distilată (pentru 1 microplacă: 15 ml de Soluție de Spălare + 285 ml de apă distilată).

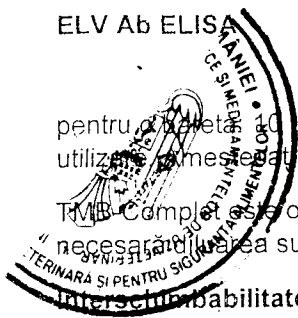
Este posibil ca în flaconul cu Soluție de Spălare să se formeze cristale de sare. Înainte de utilizare, este necesar ca aceste cristale să fie dizolvate prin încălzirea flaconului într-o baie de apă.

Soluția de Spălare diluată este stabilă la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C timp de o săptămână.

Diluantul pentru Probe este gata de utilizare, nu este necesară diluarea suplimentară a acestuia.

Diluantul pentru Conjugat este gata de utilizare, nu este necesară diluarea suplimentară a acestuia.

Diluati Conjugatul 1:101 cu Diluant Conjugat. Adăugați Diluantul pentru Conjugat la 600 μl de Conjugat pentru a obține 60 ml de volum final (pentru 1 microplacă: 120 μl pentru a obține 12 ml,



pentru a pipetați 100 μl pentru a obține 1 ml). Diluați Conjugatul cu maxim 10 minute înainte de utilizare și amestecați bine.

TMB-Compleat este o soluție de substrat cromogen monocomponentă gata de utilizare, nu este necesară adăugarea suplimentară a acesteia

Interschimbabilitatea reactivilor

Diluantul pentru Probă, Diluantul pentru Conjugat și TMB-Compleat sunt interschimbabile în kiturile EIA furnizate de TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. Acestea dețin marcaj numeric identic (ex. Diluant pentru Probă 2, Diluant pentru Probă 3 etc). Soluția de Stopare și Soluția de Spălare sunt universale în toate kiturile.

7. Prepararea probelor și a Serurilor de Control

Amestecați ușor Diluantul de Probă înainte de utilizare.

Diluarea probelor de ser și a Serurilor de Control

Diluați bine probele amestecate și Serurile de Control (PCS-L a NCS) 1:10 cu Diluantul pentru Probă.

Ex.: 10 μl de probă + 90 μl de Probă pentru Diluant

Diluați în godeurile microplacii (consultați punctul 8 Proceduri de analiză). Amestecați bine.

Probele diluate ar trebui să fie utilizate cât mai curând posibil.

8. Proceduri de analiză

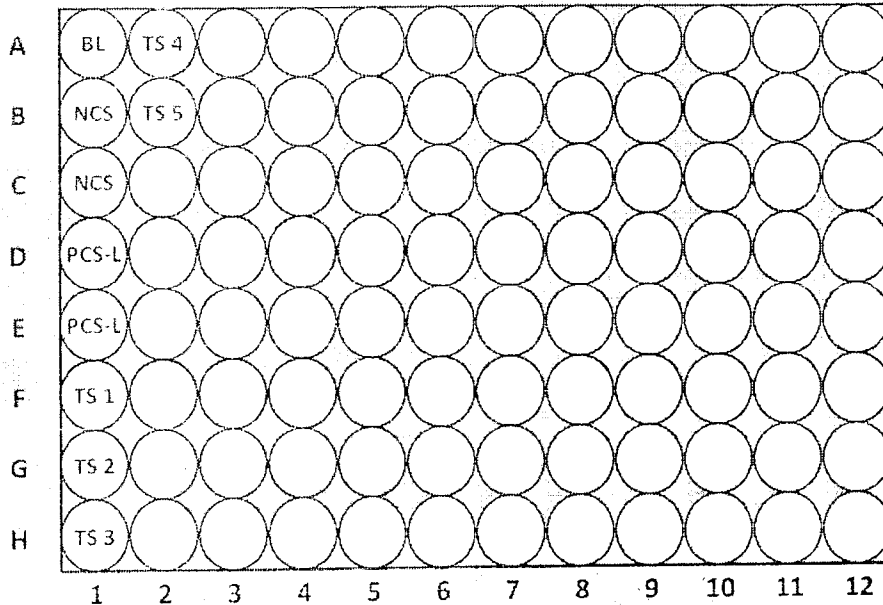
Așteptați ca toți reactivii să ajungă la temperatura camerei și agitați bine. Dacă nu utilizați toată microplaca, barețele nefolosite vor fi reamplasate în ambalajul cu desicant. Închideți bine ambalajul și depozitați la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C. A se păstra în mediu uscat!

- Distribuiți controalele și probele diluate conform protocolului de testare.
 - Pipetați 100 μl din Diluantul pentru Probă în godeul A1 (blank)
 - Pipetați 90 μl de Diluant pentru Probă în celelalte godeuri.
 - Pipetați 10 μl de Ser Control Negativ în 2 godeuri (B1, C1)
 - Pipetați 10 μl de Ser Control Pozitiv în 2 godeuri (D1, E1)
 - Pipetați 10 μl de probe analizate în celelalte godeuri cu Diluantul pentru Probă (F1-H12)
 - Agitați bine (folosind agitatorul pentru microplaci)
- Acoperiți microplaca cu capacul și incubați la 37°C timp de 60 de minute sau la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C într-o cameră de aer umed peste noapte (14-18 ore). Înainte de aspirare, incubați microplaca la temperatura camerei, timp de 15 minute.
- Aspirați conținutul godeurilor și spălați de 4 ori cu Soluție de Spălare cu concentrația de curățare corespunzătoare. Umpleți godeurile până la margine. La final, răsturnați microplaca și tapotați-o ușor pe hârtie absorbantă pentru a îndepărta resturile de soluție.
- Pipetați 100 μl de Conjugat la concentrație de lucru corespunzătoare în toate godeurile
- Acoperiți microplaca cu capacul și incubați la 37°C timp de 30 de minute.
- Aspirați conținutul godeurilor și spălați de 4 ori cu Soluție de Spălare de lucru. Umpleți godeurile până la margine. La final, răsturnați microplaca și tapotați-o ușor pe hârtie absorbantă pentru a îndepărta resturile de soluție.
- Pipetați 100 μl de TMB-Complete în toate godeurile. Evitați contaminarea – consultați punctul 13 Note procedurale).
- Acoperiți microplaca cu capacul și incubați la temperatura camerei timp de 15 de minute.
- Opriti reacția adăugând 100 μl de Soluție de Stopare în aceeași ordine și la aceleași intervale la care a fost adăugat substratul.
- Citiți intensitatea culorii din godeuri în raport cu godeul liber (A1) cu ajutorul fotometrului setat la 450 nm. Absorbanța ar trebui să fie citită în interval de 30 de minute de la stoparea reacției.



Observați formarea culorii albastre în special în godeurile cu Ser Control Pozitiv-limită (PCS-L) în cazul în care reacția este mai slabă, cauzată de exemplu de o temperatură mai scăzută în camera de reacție. Prelungiți incubarea cu substrat la până la 30 de minute. Stopați reacția atunci când intensitatea culorii PCS-L corespunde valorii de absorbantă 0,500 – 2,500.

9. Protocol de testare



BL 100 µl Diluant pentru Probă (Liber)

NCS 100 µl diluat

PCS-L 100 µl diluat

TS 1-x 100 µl probă analizată diluată

10. Controlul calității

Analiza este validă dacă:

Absorbanța din godeul blank este mai mică decât 0,200.

BLANK < 0,200

Absorbanța Serului de Control Negativ este mai mică decât 1/3 ori din absorbanta Serului Control Pozitiv- limită

$$|NCS| < 1/3 \times |PCS-L|$$

Absorbanța Serului de Control Pozitiv - limită se încadrează în intervalul 0,500 – 2,500.

$$0.500 < |PCS-L| < 2.500$$

Dacă nu sunt îndeplinite specificațiile de mai sus, testul nu este valid și trebuie repetat.

11.

Calcularea și interpretarea rezultatelor

Calcularea raportului S/P

Împărțiți absorbanța probei testate la valoarea medie a absorbanței Serului de Control Pozitiv - limită (PCS-L), măsurată în aceeași rundă de analiză:

$$S/P = \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Mean absorbance of PCS-L}} \times 100 [\%]$$

Legendă:

Absorbance of sample = absorbanță probă

Mean absorbance of PCS-L = valoare medie absorbantă PCS-L

Tabelul 1 Interpretarea rezultatelor analizei probelor mixte

S/P[%]	Țvaluare
Mai mică de 30	negativ
Între 30 și 40	La limită
Mai mare de 40	pozitiv

În cazul rezultatelor la limită examinarea va trebui repetată. Colectați și analizați o nouă probă.

Tabelul 2 Interpretarea rezultatelor analizei probelor individuale

S/P[%]	Țvaluare
Mai mică de 40	negativ
Mai mare de 40	pozitiv

Rezultatele la limită nu pot fi utilizate pentru probele individuale

12. Măsurile de siguranță

Kitul servește numai la diagnosticarea *in vitro*.

Serurile, Conjugatele, Diluanții pentru Probă, Diluanții pentru Conjugat și alte materiale aflate ce intră în contact cu probele analizate vor fi manipulate ca potențial infecțioase.

Unii reactivi conțin azidă de sodiu, care este un compus toxic. Evitați contactul cu pielea.

Soluția de Stopare conține soluție de acid diluată. Evitați contactul cu ochii și cu pielea!

Este necesară respectarea regulilor și reglementărilor locale cu privire la siguranță.

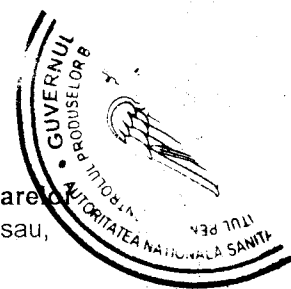
În caz de contact cu ochii, spălați cu multă apă și consultați medicul. În caz de contact cu pielea și cu îmbrăcămintea, îndepărtați toate hainele contaminate. Spălați pielea cu săpun și cu multă apă curată. În caz de contact cu soluție ce conține ser, dezinfectați pielea. În caz de ingerare accidentală clătiți gura cu apă potabilă și consultați medicul.

Eliminarea resturilor

Toate materialele utilizate la efectuarea analizei vor fi tratate ca potențial infecțioase, ca urmare a contactului cu materiale biologice. Prin urmare, vor fi eliminate împreună cu deșeurile biologice.

Eliminarea unui kit expirat

Dezasamblați kitul și eliminați componentele ca materiale biologice. Eliminați ambalajul conform reglementărilor locale.



13. Observatii referitoare la procedura

Pentru obținerea unor rezultate fiabile este necesară **respectarea cu strictețe a următoarelor Instrucțiuni de utilizare**. Vârfurile și articolele de sticlă folosite vor fi întotdeauna curate sau, preferabil, vor fi de unică folosință.

Lamele – pentru a împiedica condensarea apei pe suprafața microplăcii, permiteți întotdeauna ca ambalajul care conține microplaca să se încălzească la temperatura camerei înainte de utilizare.

Soluția de Spălare – pentru prepararea Soluției de Spălare de lucru utilizați apă distilată de calitate ridicată.

Procedura de spălare – respectați numărul de cicluri de spălare specificat și umpleți godeurile până la marginea de sus.

TMB-Compleat – vasul utilizat pentru pipetarea cu pipeta multicanal nu va fi utilizat pentru alți reactivi. Nu distribuiți surplusul de TMB-Compleat din vasul de pipetare înapoi în flacon.

Rezultatele nereproductibile ar putea fi cauzate de utilizarea de metodologii necorespunzătoare, precum:

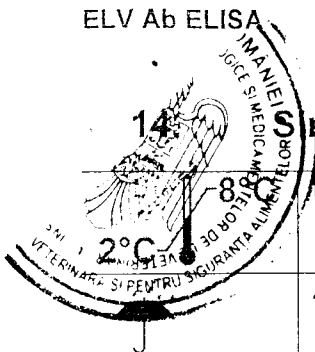
- Amestecarea insuficientă a reactivilor și probelor înainte de utilizare
- Închiderea necorespunzătoare a flacon
- Utilizarea aceluiași vârf pentru pipetarea de reactivi diferiți
- Expunerea reactivilor la temperaturi excesive; contaminare bacteriană sau chimică
- Spălarea insuficientă sau umplerea insuficientă a godeurilor (godeurile ar trebui să fie umplute până la marginea de sus), aspirarea necorespunzătoare a resturilor de Soluției de Spălare
- Contaminarea marginilor godeurilor cu Conjugat sau cu probe
- Utilizarea de reactivi din kituri provenite din loturi diferite
- Contactul reactivilor cu oxidanți, metale grele și sărurile aferente.

Kitul ar putea fi utilizat pentru examinări secvențiale. La prepararea de soluții de lucru utilizați numai cantitatea de reactivi necesară pentru analiză.








Kitul ar putea fi utilizat cu toate tipurile de analizoare EIA automate.

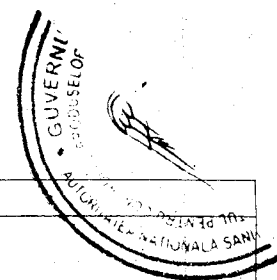
Dacă este necesar, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. poate oferi o modificare autorizată a Instrucțiunilor de utilizare pentru tipul de analizor specific.

Producătorul nu poate garanta funcționarea corespunzătoare a kitului dacă nu sunt respectate cu strictețe instrucțiunile cu privire la procedura de efectuare a analizei.














Simboluri Instrucțiuni de utilizare

	Limite temperatură
	A se păstra în mediu uscat
	Data expirare
	Număr lot
	Fabricat de
	Consultați instrucțiunile
	Număr catalog
	Număr de teste
	Bune practici de producție



Rezumat protocol EBLV Ab ELISA

Nr. pas	Simbol	Pași analiză
1		Pipetați Diluant pentru Probă Godeul Blank – 100 μ l Alte godeuri – 90 μ l
2		Pipetați Controale și probe nediluate - 10 μ l Godeul Blank – godeu gol
3		<ul style="list-style-type: none"> • Incubați la 37°C timp de 60 de minute • Incubați la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C peste noapte (14-18 ore)
4		Aspirați și spălați godeurile de 4 ori
5		Pipetați Conjugat - 100 μ l Inclusiv Godeul Blank
6		Incubați la 37°C timp de 30 de minute
7		Aspirați și spălați godeurile de 4 ori
8		Pipetați Substrat (TMB-Complet) - 100 μ l Inclusiv Godeul Blank
9		Incubați la temperatura camerei timp de 15 de minute
10		Pipetați Soluție de Stopare - 100 μ l Inclusiv Godeul Blank
11		Citiți intensitate culoare la 450 nm



EBLV Ab ELISA 480

- CONJUGAT** 5 x 96 **LOT** 0100083629
- DILUENT 13** 1 x 0.4 ml **LOT** 0100083630
- CONJ. DILUENT 11** 1 x 0.4 ml **LOT** 0100083628
- SUBSTRAT 5** 1 x 0.8 ml **LOT** 0100083631
- SOLUTIA DE SPALARE 20X** 1 x 240 ml **LOT** 0100078006
- SOLUTIA DE STOPARE** 1 x 70 ml **LOT** 0100083626
- SOLUTIA DE SPALARE 20X** 1 x 60 ml **LOT** 0100074565
- SOLUTIA DE STOPARE** 2 x 60 ml **LOT** 0100073473
- SOLUTIA DE STOPARE** 1 x 60 ml **LOT** 0100067606

LOT 0100083618
REF EBL480
 2024-05
 V 25

TestLine EBLV

LOT 0100083631

CONJUGAT 2024-09

GMP

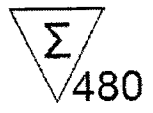
0.8 ml

2°C/8°C



EBLV Ab ELISA 480

REF EBL480



LOT 0100083618



GMP

2024-05



In cooperare cu Institutul Veterinar de Cercetare, Republica Ceha



TestLine

EBLV

MICROPLACA

LOT 0100083629

2024-08



GMP 2°C/8°C

TestLine EIA

SOLUTIE DE SPALARE 20X

60 ml



LOT 0100073473

2025-01

GMP

2°C/8°C



EIA

+420 549 121 239

LOT 0100067606

STOP

2024-08

60 ml

GMP 2°C/8°C



Contine acid metansulfonic

TestLine Clinical Diagnostics s.r.l.
Calea 13.11.2018 Eroilor 131, Ploiesti, Romania

TestLine EIA

SUBSTRAT 5

60 ml

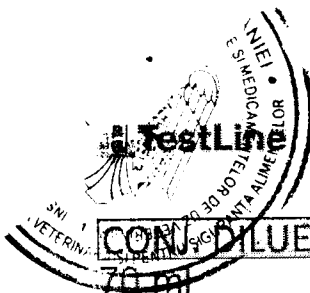


LOT 0100074565

2024-05

GMP

2°C/8°C



TestLine EIA

LOT 0100083626

CONJ. DILUENT 11

2024-10

GMP



2°C / 8°C

TestLine EIA

LOT 0100078006

DILUENT 13

2024-05

240 ml

GMP



2°C / 8°C

TestLine EBLV

LOT 0100083628

PCS-L

2024-09

0.4 ml

GMP

2°C / 8°C



TestLine EBLV

LOT 0100083630

NCS

2024-09

0.4 ml

GMP

2°C / 8°C





4. Inner labels (examples)

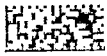
MICROPLATE

TestLine EBLV

MICROPLATE

LOT 0100083629

2024-08



GMP

20°C / 4°C

NCS

TestLine EBLV

LOT 0100083630

NCS

2024-09

GMP

0.4 ml

20°C / 4°C



PCS-L

TestLine EBLV

LOT 0100083628

PCS-L

2024-09

GMP

0.4 ml

20°C / 4°C



CONJUGATE

TestLine EBLV

LOT 0100083631

CONJUGATE

2024-09

GMP

0.8 ml

20°C / 4°C



DILUENT 13

TestLine EIA

LOT 0100078006

DILUENT 13

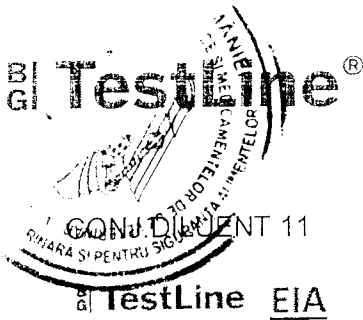
2024-05


240 ml


GMP




20°C / 4°C




CONJ. DILUENT 11
70 ml



LOT 0100083626
 2024-10
GMP
2°C 8°C


SUBSTRATE 5
TestLine EIA

SUBSTRATE 5
60 ml



LOT 0100074565
 2024-05
GMP
2°C 8°C



WASH
TestLine EIA

WASH 20x
60 ml


LOT 0100073473
 2025-01
GMP
2°C 8°C

STOP

STOP
60 ml


TestLine EIA ☎ +40 649 121 239
LOT 0100067606
 2024-08
GMP
2°C 8°C

Compania este acreditată în conformință cu
Norma EN ISO 13485
TestLine EIA Diagnostic
Măgurele, 510 00 Brno-Kralupy Pole, Czech Republic

