

Instrucțiuni de utilizare

EBLV Ab ELISA

REF EBL480



Kit de uz profesional

GMP



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 68, 612 00 Brno, Czech Republic

Tel.: +420 541 248 311

FAX: +420 541 243 390

E-mail: info@testlinecd.com

www.testlinecd.cz

www.testlinecd.com

&

Veterinary Research Institute

Hudcova 70, 621 32 Brno

Czech Republic

Tel.: +420 533 331 111

FAX.: +420 541 211 229

E-mail: podatelna@vri.cz

www.vri.cz

CUPRINS

1	Înregistrări document.....	3
2	Scop prevăzut.....	3
3	Introducere.....	3
4	Principiul testului	3
5	Materiale furnizate	4
6	Materiale necesare dar care nu sunt furnizate	5
7	Depozitare și stabilitate.....	5
8	Pregătirea reactivilor.....	5
9	Pregătirea probelor și a serurilor de control	6
10	Procedura de analiză.....	6
11	Protocol de lucru	7
12	Valabilitatea analizei.....	8
13	Interpretarea rezultatelor	8
14	Performanță analitică	9
15	Precauții de siguranță	10
16	Observații procedurale.....	11
17	Simboluri.....	12

1 Înregistrări document

Nr. Revizie	Nr. Versiune	Descrierea reviziei
ZM01886	27	Ajustarea valabilității testului pentru PCS-L

2 Scop prevăzut

Test de imunologie cu enzimă pentru detectarea anticorpilor la virusul leucozei bovine în probele de ser sanguin individuale și cumulate.

3 Introducere

Virusul leucozei enzootice bovine (EBLV) aparține familiei *Retroviridae*. Leucoza enzootică bovină (LBE) 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 al anticorpilor este determinat împotriva glicoproteinei de suprafață gp-51 și proteinei interne p-24. Doar aproximativ 11% din animalele infectate dezvoltă simptome de limfocitoză și limfosarcomatoză persistentă.

Tehnicile de diagnosticare actuale 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 cu AGPT. Această tehnică îndeplinește cerințele pentru analiza probelor cumulate din aceste materiale cu o sensibilitate corespunzătoare a 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 acumulate.

4 Principiul testului

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

Antigenul utilizat

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

5 Materiale furnizate

MICROPLATE	Placă microtitrare acoperită cu antigen, 12x8 godeuri în ambalaj cu desicant	5 bucăți
NCS	Ser control negativ 10 x ser bovin concentrat fără anticorpi specifici	1 x 0,4 ml
PCS-L	Ser Control Pozitiv - limită 10 x ser bovin concentrat cu anticorpi specifici	1 x 0,4 ml
CONJUGATE	Conjugat (concentrat x 100) anticorpi anti IgG bovină marcați cu peroxidază, concentrație x 100	1 x 0,8 ml
DILUENT 13	Diluant pentru probă 13 Tampon cu stabilizatori de proteină, gata de utilizare	1 x 240 ml
CONJ.DILUENT 11	Diluant pentru conjugat 11 Tampon cu stabilizatori de conjugat, gata de utilizare	1 x 70 ml
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 x 20	2 x 60 ml
STOP	Soluție de oprire Soluție acidă, gata de utilizare	1 x 60 ml

6 Materiale necesare dar care nu sunt furnizate

Pipete cu un singur canal și multicanal

Vârfuri de unică folosință

Spălător microplacă

Temporizator

Agitator microplacă (nu este necesar la analiza unui număr mai mic de probe)

Incubator (37 °C) cu cameră de control al umidității aerului

Cititor microplacă

7 Depozitare și stabilitate

Depozitați kitul la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C. Nu congelați. Dacă este depozitat așa cum este descris mai sus, data de expirare indicată pe etichetă este valabilă. Data de expirare este indicată pe ambalaj. După deschidere, kitul trebuie utilizat în trei luni.

Pregătirea și depozitarea probelor

Pot fi utilizate pentru analiză următoarele lichide corporale: ser și plasmă citrat. Se recomandă o eprubetă de prelevare a sângelui coagulat pentru prelevarea serului. Se recomandă o pungă de prelevare a plasmei citrat pentru prelevarea plasmei.

Urmați instrucțiunile producătorului atunci când utilizați probe comerciale sau alte probe modificate specific.

Probele clinice prelevate prin proceduri medicale standard în flacoane standardizate sunt gata pentru utilizarea imediată. Centrifugarea sau alte tipuri de separare nu sunt necesare.

Probele pot fi depozitate între +2 °C și +8 °C timp de 48 de ore. Pe o perioadă mai lungă, depozitați probele la -20 °C.

8 Pregătirea 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 soluția de spălare să se formeze cristale de sare. Înainte de utilizare, este necesară dizolvarea acestor cristale 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 probă 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 pentru conjugat. Adăugați diluantul pentru conjugat la 600 μl de conjugat pentru a obține 60 ml de volum final (pentru o microplacă: 120 μl pentru a obține 12 ml, pentru o bareță: 10 μl pentru a obține 1 ml). Diluați conjugatul cu maxim 10 minute înainte de utilizare. Amestecați bine.

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

Caracterul interschimbabil al reactivilor

Diluantul pentru probă, diluantul pentru conjugat și TMB-Complete sunt interschimbabile în kiturile EIA furnizate de TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. Acesta au marcaj numeric identic (ex. diluant pentru probă 2, diluant pentru probă 3, etc.). Soluția de oprire și soluția de spălare sunt universale în toate kiturile.

9 Pregătirea probelor și a serurilor de control

Amestecați ușor diluantul pentru probă înainte de utilizare.

Diluarea probelor de ser și a serurilor de control

Diluati bine probele amestecate și serurile de control (PCS-L și NCS) 1:10 cu diluantul pentru probă. Ex.: 10 µl de probă + 90 µl de diluant pentru probă.

Diluati în godeurile plăcii de microtitrare (consultați Capitolul Procedura de analiză). Amestecați bine. Probele diluate trebuie să fie utilizate în cel mai scurt timp.

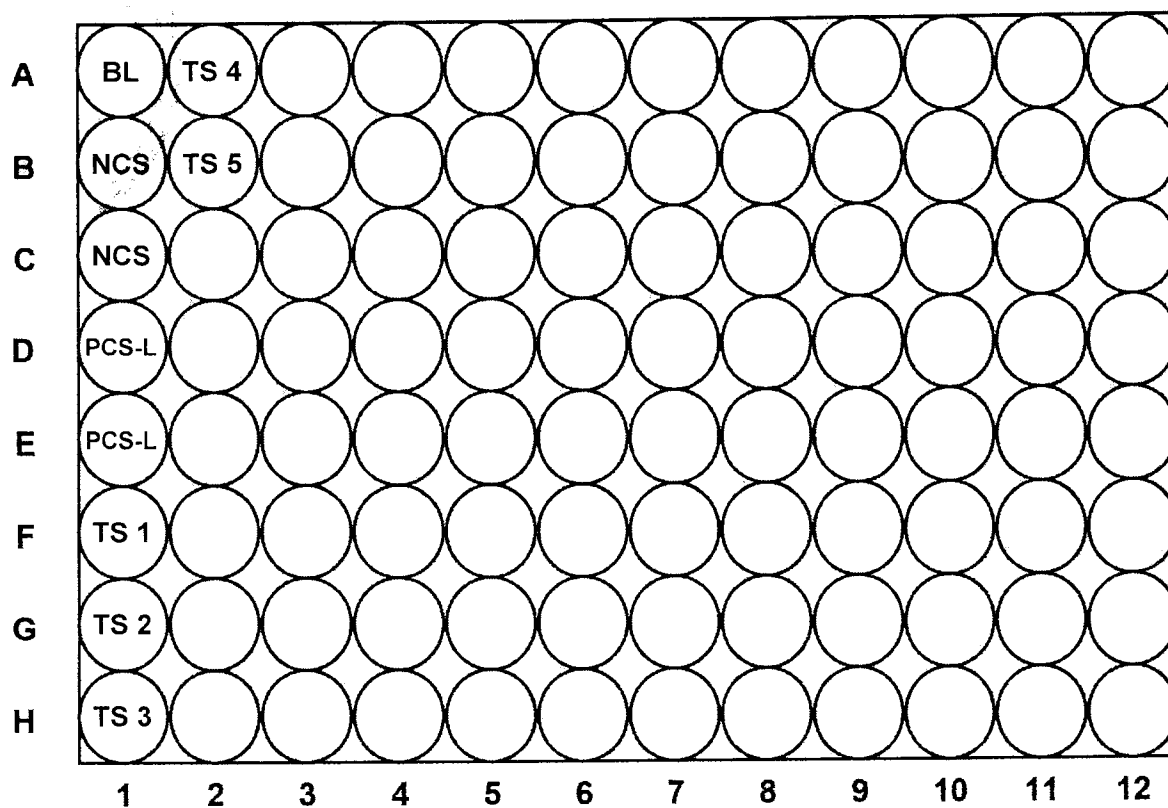
10 Procedura de analiză

Așteptați ca toți reactivii să ajungă la temperatura camerei și amestecați bine. Dacă nu utilizați o microplacă întreagă, reamplasați baretele nefolosite în ambalajul cu desicant. Etanșați bine ambalajul și depozitați la o temperatură între +2 °C și +8 °C. A se păstra în mediu uscat!

1. Distribuți controalele și probele diluate conform protocolului de lucru.
 - Pipetați 100 µl din diluantul pentru probă în godeul A1 (liber).
 - 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 - limitați în 2 godeuri (D1, E1).
 - Pipetați 10 µl de probe analizate în celelalte godeuri cu diluantul pentru probă (F1 - H12).
 - Amestecați bine (utilizând agitatorul pentru placa de microtitrare).
2. 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 control al umidității aerului peste noapte (14 - 18 ore). Înainte de aspirare, incubați microplaca la temperatura camerei timp de 15 minute.
3. Aspirați conținutul godeurilor și spălați de 4 ori cu soluția de curățare cu concentrația de lucru. Umpleți godeurile până la margine. La final, tamponați din abundență microplaca inversată pe o hârtie absorbantă pentru a îndepărta reziduurile de soluție.
4. Pipetați 100 µl de conjugat cu concentrația de curățare de lucru în toate godeurile.
5. Acoperiți cu capacul microplaca și incubați la 37 °C timp de 30 de minute.
6. Aspirați conținutul godeurilor și spălați de 4 ori cu soluția de curățare cu concentrația de lucru. Umpleți godeurile până la margine. La final, tamponați din abundență microplaca inversată pe o hârtie absorbantă pentru a îndepărta reziduurile de soluție.
7. Pipetați 100 µl de TMB-Complete în toate godeurile. Evitați contaminarea - consultați Capitolul Observații procedurale.
8. Acoperiți cu capacul microplaca și incubați la temperatura camerei timp de 15 de minute.
9. Opriți reacția adăugând 100 µl de soluție de oprire în aceeași ordine și la aceleași intervale la care a fost adăugat substratul.
10. Citiți intensitatea culorii din godeuri comparativ cu godeul liber (godeul A1) utilizând un fotometru setat la 450 nm. Absorbanța trebuie citită în 30 de minute de la oprirea reacției.

Observați formarea culorii albastre în special în godeurile cu Ser Control Pozitiv - limită (PCS-L). În cazul unei reacții mai slabe cauzate, de exemplu, de o temperatură mai scăzută a camerei, prelungiți incubarea cu substrat până la 30 de minute. Opriți reacția când intensitatea culorii PCS-L corespunde valorii de absorbanță 0,500–2,500.

11 Protocol de lucru



BL	100 μ l	diluant pentru probă (liber)	
NCS	100 μ l	diluat	NCS
PCS-L	100 μ l	diluat	PCS-L
TS 1-x	100 μ l	probă analizată diluată	

12 Valabilitatea analizei

Analiza este valabilă dacă:

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

$$\text{LIBER} < 0,200$$

Absorbanța serului de control negativ este mai mică decât 1/3 ori din absorbanța serului de control pozitiv - limită.

$$\text{NCS} < 1/3 \times \text{PCS-L}$$

Absorbanța serului de control pozitiv - limită este mai mare de 0,500.

$$\text{PCS-L} > 0,500$$

Dacă nu sunt îndeplinite specificațiile de mai sus, analiza nu este valabilă și trebuie repetată.

13 Interpretarea rezultatelor

Calcularea raportului S/P

Împărțiți absorbanța probei analizate la valoarea medie a absorbanței serului de control pozitiv - limită (PCS-L) măsurată în același ciclu de analiză:

$$\text{S/P} = \frac{\text{Absorbanța probei}}{\text{Absorbanța medie a PCS-L}} \times 100 [\%]$$

Interpretarea rezultatelor analizei este descrisă în tabelele (Tabel 1 și Tabel 2).

Tabel 1 Interpretarea rezultatelor analizei probelor mixte

S/P [%]	Evaluare
Mai mică de 30	negativ
30 până la 40	la limită
Mai mare sau egală cu 40	pozitiv

Examinarea trebuie repetată în cazul rezultatelor la limită. Prelevați și analizați o probă nouă.

Tabel 2 Interpretarea rezultatelor analizei probelor individuale

S/P [%]	Evaluare
Mai mică de 40	negativ
Mai mare sau egală cu 40	pozitiv

Rezultatul la limită nu poate fi utilizat pentru probele individuale.

14 Performanță analitică

14.1 Specificitate și sensibilitate

Specificitatea de diagnosticare a fost determinată în panelul cu seruri negative, numărul de seruri analizate a fost de 450. Sensibilitatea de diagnosticare a fost determinată în panelul cu seruri pozitive, numărul de seruri analizate a fost de 180. Specificitatea și sensibilitatea sunt bazate pe rezultatele obținute.

Specificitate: 99,78 %

Sensibilitate: 99,99 %

14.2 Precizie și reproductibilitate

Reproductibilitatea **intra-analizei** a fost determinată prin analiza probelor de diferite niveluri de reactivitate a anticorpilor de cel puțin 16 ori în cadrul unei analize. Coeficientul de variație (CV) al probelor reactive a fost de **3,48 %**.

Reproductibilitatea **intra-analizei** a fost determinată prin analiza probelor de diferite niveluri de reactivitate a anticorpilor în 40 de cicluri de analiză diferite. CV al probelor reactive a fost de **4,87 %**.

15 Precauții de siguranță

Kitul este destinat doar utilizării pentru diagnosticare in vitro.

Serurile, conjugatul, diluantul pentru probă, diluantul pentru conjugat și alte materiale care intră în contact cu probele analizate trebuie manipulate ca fiind potențial infecțioase.

Unii reactivi conțin azidă de sodiu, un compus toxic. Evitați contactul cu pielea. Soluția de oprire conține soluție de acid diluată. Evitați contactul cu ochii și pielea!

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

Primul ajutor

În caz de contact cu ochii, spălați cu apă din abundență și consultați medicul. În caz de contact cu pielea și cu îmbrăcămintea, îndepărtați toate hainele contaminate. Spălați pielea cu săpun și cu apă curată din abundență. În caz de contact cu soluții care conțin plasmă sau probe clinice, dezinfectați pielea. În caz de ingerare accidentală, clătiți gura cu apă potabilă și consultați medicul.

Eliminarea reziduurilor

Toate materialele utilizate în efectuarea analizei trebuie tratate ca fiind potențial infecțioase ca urmare a contactului cu materiale biologice. Așadar, acestea trebuie eliminate împreună cu deșeurile biologice.

Eliminarea unui kit expirat

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

16 Observații procedurale

Pentru a obține 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 preveni condensarea apei pe suprafața microplăcii, permiteți întotdeauna ca ambalajul care conține microplaca să se încălzească la temperatura camerei înainte de a-l deschide.

Soluția de spălare - pentru prepararea soluției de spălare cu concentrație de lucru utilizați apă distilată de calitate înaltă.

Procedura de spălare - respectați numărul de cicluri de spălare specificat și umpleți godeurile până la marginea superioară.

TMB-Complete - vasul utilizat pentru pipetarea cu multicanale nu va fi utilizat pentru alți reactivi. Nu distribuiți surplusul de TMB-Complete din vasul de pipetare înapoi în flacon.

Rezultatele nereproductibile pot fi cauzate de utilizarea metodologiilor necorespunzătoare.

- amestecarea insuficientă a reactivilor și probelor înainte de utilizare
- înlocuirea necorespunzătoare a capacelor flacoanelor
- utilizarea aceluiași vârf pentru pipetarea de reactivi diferiți
- expunerea reactivilor la temperaturi excesive; contaminate bacteriană sau chimică
- spălarea insuficientă sau umplerea insuficientă a godeurilor (godeurile trebuie umplute până la marginea superioară), aspirarea necorespunzătoare a reziduurilor 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 acestora

Limitarea tehnică a probelor

Pentru dezvoltarea și fabricarea kitului au fost utilizate materiale de origine umană precizate la scopul prevăzut provenite de la populația de donatori. Kiturile sunt prevăzute pentru a fi utilizate de către populația generală, dacă nu se specifică altfel.

Atunci când utilizați probe de la alte populații specifice (populații cu comorbidități, imunocompromise, persoane însărcinate, populația pediatrică), trebuie luat în considerare în contextul cunoștințelor de specialitate și a cunoștințelor științifice actuale riscul unui efect specific asupra rezultatului testului aplicat din cauza, de exemplu, a interferenței sau reactivității încrucișate.

Alte observații

Kitul poate fi utilizat pentru examinări secvențiale. La prepararea soluțiilor cu concentrație de lucru, utilizați numai cantitatea de reactivi necesară pentru analiză.

Kitul poate 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.

17 Simboluri



Limitări de temperatură



A se păstra în mediu uscat



Data de expirare



Număr lot



Fabricat de



Consultați instrucțiunile (eIDU)



Număr catalog



Numărul de teste



Bune practici de producție

Schema testului EBLV Ab ELISA

Nr. pas	Simbol	Pași analiză
1		Pipetați diluant pentru probă Godeul liber - 100 µl Alte godeuri - 90 µl
2		Pipetați seruri de control nediluate și plasmă (probe) - 10 µl Godeu liber = godeul gol
3		– 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 µl Inclusiv godeul liber
6		Incubați la 37°C timp de 30 de minute
7		Aspirați și spălați godeurile de 4 ori
8		Pipetați substrat (TMB-Complete) - 100 µl inclusiv godeul liber
9		Incubați la temperatura camerei timp de 15 minute.
10		Pipetați soluție de oprire - 100 µl Inclusiv godeul liber
11		Citiți intensitatea culorii la 450 nm

EBLV Ab ELISA 480			
MICROPLACA	5 x 96	LOT	0100083629
NCS	1 x 0.4 ml	LOT	0100083630
PCS-L	1 x 0.4 ml	LOT	0100083628
CONJUGAT	1 x 0.8 ml	LOT	0100083631
DILUENT 13	1 x 240 ml	LOT	0100078006
CONJ. DILUENT 11	1 x 70 ml	LOT	0100083626
SUBSTRAT 5	1 x 60 ml	LOT	0100074565
SOLUTIA DE SPALARE 20X	2 x 60 ml	LOT	0100073473
SOLUTIA DE STOPARE	1 x 60 ml	LOT	0100067606

LOT 0100083618
2024-05
REF EBL480
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

2024-05



In cooperare cu Institutul Veterinar de Cercetare, Republica Ceha



GMP

 **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

+400 649 121 239

LOT 0100067606

STOP

60 ml



Contine acid metansulfonic

TestLine Clinical Diagnostics s.r.l.
Via della Seta 22 00186 Roma, Italy

 2024-08

GMP

2°C  8°C



 **TestLine** **EIA**

SUBSTRAT 5

60 ml



LOT 0100074565

 2024-05

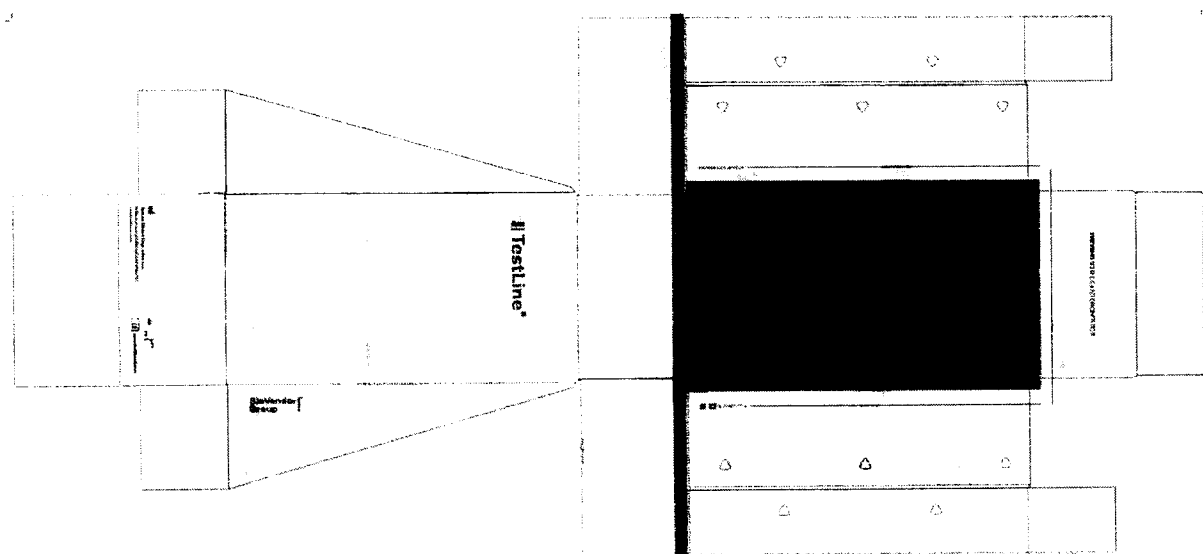
GMP

2°C  8°C 

**B
G** | **TestLine®**



5. Cutia cu adresa producătorului



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 68, 612 Brno, Republica Cehia

www.teslinecd.com

 **TestLine** EIA

LOT 0100083626

CONJ. DILUENT 11

 2024-10

70 ml

GMP



2°C  8°C

 **TestLine** EIA

LOT 0100078005

DILUENT 13

 2024-05

240 ml

GMP



2°C  8°C

 **TestLine** EBLV

LOT 0100083628

PCS-L

 2024-09

GMP

0.4 ml

2°C  8°C



 **TestLine** EBLV

LOT 0100083630

NCS

 2024-09

GMP

0.4 ml

2°C  8°C



2