

Veterinary Medical
Research & Development

Kit de detectie anticorpi pentru virusul Anemiei Infectioase Ecvine

USDA Product Code 5515.21

Instructiuni de testare pentru numarul de catalog: 400-200

Descriere Generala:

Acest test de imunodifuzie (ID) pentru virusul anemiei infectioase ecvine (EIAV) detectează anticorpii precipitanți în seruri de ecvidee față de proteina internă cu masa moleculară de 26000 (p26) purificată a virusului AIE recombinant.

Probele de ser, dacă sunt pozitive, vor forma o linie care se va uni cu liniile de control pozitive sau care va devia liniile de control pozitive spre interior aproape de godeul cu proba fără a se forma o linie vizibilă. Serurile negative nu vor forma nicio linie care să se unească cu linia de control pozitivă și nici nu determină devierea liniilor de control pozitive.

Kitul Contine:

1 flacon A.....Antigen VAIE P26, 3,35 ml

1 flacon R.....Ser control pozitiv, 10 ml

Acești reactivi sunt suficienți pentru a efectua până la 200 de teste.

Materiale necesare, dar care nu sunt incluse în Kitul de testare.

Plită, autoclav sau cuptor cu microunde, balanta, flacon 250 ml, pipete de laborator, frigider, matrita standard pentru gel, pompa de vid sau pompa de filtrare cu apă, micropipetor, varfuri micropipete, camera din plastic, sursa luminoasa de mare intensitate cu fascicul îngust, baie de apa 45°C (recomandat, dar nu obligatoriu), agar noble, NaOH, acid boric, apa distilata sau deionizata, placi petri din plastic cu diametrul de 100mm sau tavă din plastic de 45 x 90 mm.

Depozitare și stabilitate

Nu utilizați componente din alte truse. Păstrați toți reactivii la 2-7 ° C. Nu înghețați. Reactivii vor rămâne stabili până la data expirării când vor fi stocați conform instrucțiunilor. Nu utilizați kitul de testare după data de expirare tipărită pe cutie. Folosiți echipament curat pentru a evita contaminarea reactivilor.

Prepararea gelului de agar

1. Se prepară tamponul de borat prin amestecarea a 2 g NaOH și 9 g acid boric într-un litru de apă distilată. PH-ul rezultat ar trebui să fie de aproximativ 8,6.

2. Se prepară 1% soluție de agar noble în tamponul de borat.
3. Soluția se fierbe până se dizolvă și apoi se autoclavează la presiune de 15 lb/in² timp de 7 minute. Alternativ, incubati soluția de agar / soluție tampon la intervale de 30 de secunde timp de aproximativ 3 minute sau până când agarul este complet dizolvat.
4. Se răcește soluția la 45°C și apoi se transferă 15 ml de soluție în placile petri cu diametru de 100 mm sau 11 ml în tăvi de 45 x 90 mm. Agarul trebuie să aibă grosimea de 2,8 mm.
5. Lăsați agarul să se răcească într-un mediu lipsit de praf. Scoateți capacul în timpul răcirii pentru a permite evacuarea vaporilor de apă. Pentru cele mai bune rezultate, recomandăm ca plăcile proaspăt turnate să fie depozitate peste noapte la 2-7 ° C înainte de utilizare. Plăcile sau tăvile de agar netăiate pot fi depozitate la 2-7 ° C în pungi cu zip-lock pentru o perioadă de până la o săptămână. Verificați agarul depozitat înainte de utilizare pentru a vă asigura că acesta nu este nici deshidratat, nici acoperit cu umiditate.

Taierea godeurilor în gelul de agar

Se utilizează un model cu șapte godeuri, cu un singur godeu central și șase godeuri în jurul acestuia. Godeurile sunt la 2,4 mm distanță unele de altele și 5,3 mm în diametru. Agarul este tăiat după ce s-a întărit suficient, astfel încât marginile tăiate ale godeurilor să nu se descompună atunci când sunt îndepărtate dopurile de agar.

Dopul de agar este aspirat din godeuri folosind o canulă de metal sau de sticlă cu o mică deschidere (1-2 mm în diametru), conectat la o linie de vid. Trebuie avut grijă să se evite separarea agarului de placă. Dacă se observă umezeală în godeuri înainte de introducerea reactivilor sau probelor, aceasta trebuie îndepărtată prin aspirație sau lăsată să se evapore. Plăcile trebuie folosite în aceeași zi în care sunt tăiate.

Cerinte pentru probe

Proba de testat trebuie să fie ser. Proba de ser trebuie separată de cheag cât mai curând posibil și depozitată la 2-7 ° C sau depozitată congelată până la testare. Cu toate acestea, serul poate fi depozitat fie pe cheag sau fără, la 2-7°C timp de până la 28 de zile până la testare. Serul separat poate fi înghețat pe o perioadă nedeterminată până la testare. Serul hemolizat poate colora agarul, dar nu s-a demonstrat că afectează rezultatul testului. Cu toate acestea, nu se recomandă testarea probelor hemolizate sau contaminate.

Umplerea godeurilor și incubarea placilor cu agar

Antigenul (A) se va repartiza în godeul din centru cu o micropipeta setată la 50 µl. Cincizeci de microlitri de ser de control pozitiv (R) se vor repartiza în godeuri de fiecare parte a probei (probelor) de testat (figura 1).

Acest aranjament oferă o linie de control pozitivă de fiecare parte a serului de testat, facilitând astfel determinarea exactă a liniilor de identitate. Un total de trei probe pot fi testate în fiecare model, folosind din nou câte 50 µl pentru fiecare godeu.

Godeurile se vor umple la nivel cu agar, fără să formeze menisc. Serul sau antigenul nu trebuie să treacă deasupra agarului. Lăsați plăcile să stea câteva minute înainte de a le mișca, pentru a reduce posibilitatea de scurgere.

Plăcile se vor incuba la temperatura camerei ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) într-o cameră umedă închisă. Dacă temperatura camerei este mai mare de 25°C sau sub 20°C , trebuie utilizat un incubator de 22°C .

Validarea testului

Pentru ca testul să fie valid, liniile de referință (între godeurile cu Ser de referință pozitiv și godeul central cu Antigen VAIE) trebuie să fie ușor de vizualizat. Aceste linii trebuie să fie clar vizibile până la marginea godeurilor cu probe negative. Dacă nu, testul nu poate fi interpretat corect.

Interpretarea rezultatelor

Pentru a asigura iluminarea pentru citire, utilizați o sursă de lumină reglabilă, cu un fascicul îngust, pentru diferite intensități și poziții. Reacția trebuie observată pe fundal negru. O lupă este utilă în unele cazuri.

Dispozitivele pentru observarea reacțiilor de culoare prin imunodifuzie nu sunt adecvate pentru citirea acestui test. Sunt necesare minimum 24 de ore pentru a avea loc o reacție completă de imunodifuzie. Dacă reacția este completă după 24 de ore de incubare, rezultatul poate fi raportat.

Reacția este completă atunci când liniile pozitive de control intră în godeul care conține o probă negativă sau când se formează o linie distinctă specifică de identitate a serului cu cea formată de probele de ser de control pozitiv. Unele probe slab pozitive necesită 48 de ore pentru ca reacția să fie completă. Acestea trebuie retestate înainte ca rezultatele să fie raportate.

Tipul de reacție va varia în funcție de concentrația de anticorpi din proba testată. Linia de control pozitivă reprezintă baza pentru citirea testului. Dacă nu este o linie distinctă, atunci testul este nevalid și trebuie repetat.

Se observă următoarele tipuri de reacții:

1. **Negative:** Liniile de control pozitive de referință continuă în godeul cu proba de testat fără a se arcui sau cu o ușoară arcuire departe de godeul cu antigen (A) și spre serul de control pozitiv (Figura 2, S1, proba negativă).
2. **Pozitive:** Liniile de control se unesc și formează o linie continuă cu linia dintre serul de testat (S2) și antigen (A) (Figura 2).
3. **Slab pozitive:** Liniile de control pozitive de referință se arcuiesc ușor spre godeul cu antigen (A) și se îndepărtează de godeurile cu ser de control pozitiv (R), dar nu formează o linie completă între antigenul (A) și serul de testat (S3) (Figura 2). Aceste reacții necesită o observare atentă și pot fi ușor de omis. Toate probele slab pozitive trebuie retestate înainte de raportarea rezultatelor.

S-au observat reacții de imunodifuzie slabă în trei tipuri de cazuri:

- a. Mânjiile care sunt alăptați de iepe infectate dau reacții de la slab la destul de puternice care pot persista timp de până la vârsta de 5 luni datorită anticorpilor colostrali. În cazul în care iapa și mânzul sunt pozitivi, mânzul trebuie retestat la vârsta de 6 luni pentru a determina dacă devine negativ. În cazul în care iapa este negativă, mânzul ei pozitiv ar trebui considerat ca fiind infectat.
 - b. Reacții slab pozitive au fost observate în timpul perioadei de incubație a AIE. Dacă se obține o a doua probă două trei săptămâni mai târziu, reacția va fi mai puternică.
 - c. Purtatorii inaparenti care nu au semne clinice de EIA pe perioade lungi de timp pot prezenta reacții slabe la test. În aceste cazuri, retestarea are rareori ca rezultat intensificarea reacției.
4. **Intens pozitive:** Liniile de control pozitiv de referință se curbează spre godeul cu antigen înainte de a atinge godeul care conține serul de test (S1) și apare o linie lată, difuză între serul de testat (S1) și antigen (A) (Figura 3). Această linie este situată foarte aproape de godeul cu antigen (A), mai ales dacă placa este observată la 24 de ore.
5. **Linii nespecifice:** Aceste linii sunt observate între godeul cu antigen și godeul cu ser de testat. Cu toate acestea, liniile de control pozitiv de referință vor trece prin linia nespecifică și se vor continua în godeul serului de testat dacă acesta este ser negativ (nu este prezentat). Linia nespecifică nu formează o linie continuă cu liniile de control pozitiv de referință. Liniile de control pozitiv de referință vor forma unghiuri mai ascuțite cu o linie nespecifică decât cu linia de identitate specifică EIAV. Liniile nespecifice sunt formate prin reacții probă-anticorpi cu alte antigene decât EIAV p26. O probă de ser poate produce o linie VAIE specifică, precum și o linie nespecifică (Figura 3, S2). Trebuie avut grijă să fie sigur că o reacție specifică nu este ascunsă de o linie non-VAIE. Retestarea acestor probe și observarea reacțiilor la intervale frecvente poate facilita efectuarea determinărilor dacă probele sunt pozitive sau negative.
6. **Halo în jurul godeului:** Ocazional, în jurul godeului cu proba de testat se va forma un halo, datorită lipidelor sau a altui material din ser, care poate acoperi liniile de control pozitive de referință în apropierea godeului cu probă (Figura 3, S3). Dacă testul este citit la 24 și la 48 de ore, în unele cazuri rezultatele pot fi determinate înainte ca haloul să acopere reacția. Cu toate acestea, în anumite cazuri nu se poate face o determinare corectă și se solicită o altă probă.

Toate rezultatele pozitive trebuie confirmate prin retestare înainte ca acestea să fie raportate. De asemenea, probele care produc reacții dubioase trebuie retestate în duplicat înainte de a raporta rezultatele.

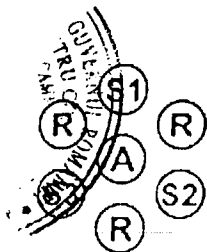


Figura 1.

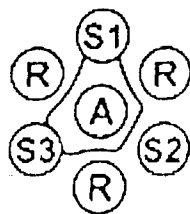


Figura 2.

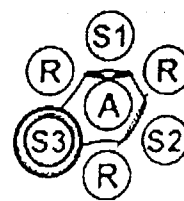


Figura 3.

Figura 2.

Caii infectați cu VAIE sunt în general considerați purtători ai virusului pe viață. Caii infectați pot să nu prezinte semne clinice luni sau ani, dar cu toate acestea să prezinte virusul AIE infecțios în sânge. Prin urmare, orice cal adult care este pozitiv în testul ID trebuie considerat ca fiind infectat.

Note pentru clienții din US:

Vânzarea și utilizarea în S.U.A. se limitează la laboratoarele aprobate de oficiali de stat și federali (USDA) pentru sănătatea animală. Laboratoarele Naționale de Servicii Veterinare vor furniza periodic probe de test codificate pentru a evalua competența laboratoarelor aprobate de USDA. Orice proba suspectă trebuie trimisă la Laboratoarele Naționale de Servicii Veterinare pentru verificare.

Precautii

Componentele kitului trebuie manipulate și eliminate ca fiind potențial periculoase. Nu mâncați, nu beți sau nu fumați acolo unde se manipulează probe de ser și reactivii din kit. Nu pipetați cu gura. Anumiți reactivi pot fi dăunători dacă sunt ingerați. Dacă este ingerat, solicitați asistență medicală. Nu utilizați reactivi expirați sau contaminați, sau reactivi din alte kituri sau serii. Nu amestecați reactivi din serii diferite ale aceluiași produs.

Componenta A, EIAV p26 Antigen, conține azidă de sodiu ca și conservant.

Componenta R, ser de control pozitiv de referință, conține azidă de sodiu ca și conservant.

Veriunea 121218

Eticheta exterioara.

Kit pentru detectia anticorpilor Anemiei Infectioase Ecvine

USDA Product Code 5515.21

A . Antigen, 1 x 3.35ml

R . Ser pozitiv de referinta pentru Control, 1 x 10 ml

Instructiuni de utilizare, 1 per kit

VMRD NUMAR DE CATALOG 400-200

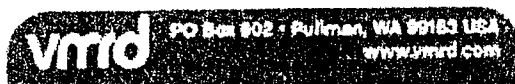
NUMAR SERIAL P160404-002

EXPIRATION: 11 May 2018

Pastrare 2-7°C Contine reagenti suficienti pentru 200 probe
A se consulta prospectul pentru instructiuni complete. Strict de uz
veterinar

Nota pentru clientii din SUA:

Vanzarea si utilizarea in SUA este restrictionata la laboratoarele aprobate
de institutiile oficiale de stat si federale pentru sanatate animala (USDA)
U.S. Ikenta Veterinara Nr. 332



Kit pentru detectia anticorpilor Anemiei Infectioase Ecvine

Antigen . 3.35 ml

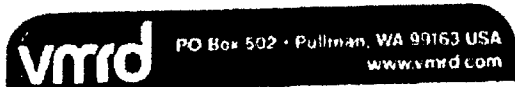
Pastrare @ 2-7°C

Nr. Lot P160404002AG

A

DE UTILIZAT VETERINAR A SE UTILIZA CONFORM
LEI VETUSC NR. 332

Eticheta Antigen



Kit pentru detectia anticorpilor Anemiei Infectioase Ecvine

Ser pozitiv de referinta pentru control

Ser . 10 ml

Pastrare @ 2-7°C

Nr. Lot P160404002RS

R

DE UTILIZAT VETERINAR A SE UTILIZA CONFORM
LEI VETUSC NR. 332

Eticheta Ser Pozitiv de referinta pentru control

Phy