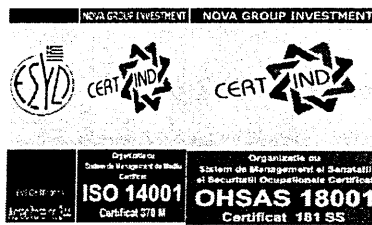


S.C. NOVA GROUP INVESTMENT S.R.L.
J40 / 6000/2001 ,CUI : RO13986464

Str. OITUZ, nr 47 C ,OTOPENI, Jud. ILFOV , ROMANIA
Tel : +(4 031)425.35.15, Fax:+ (4 031) 425.35.16
www.vetlab.ro ; E-mail: info@novagroup.ro



Kit pentru detecția anticorpilor anti virusul IBR gB

Denumire și scopul utilizării

Testul IDEXX HerdCheck IBR gB este un test imunoenzimatic pentru detecția anticorpilor anti virusul rinotraheitei bovine (BHV-1) în probe de ser, plasmă sau lapte bovin, utilizând anticorpi monoclonali anti IBR gB.

Informație generală

Rinotraheita infecțioasă bovină este o maladie infecțioasă, înalt contagioasă cauzată de Herpesvirus Bovin 1 (BHV-1). În afară de bolile respiratorii, acest virus cauzează conjunctivită, vulvovaginită, avorturi , encefalită și infecții sistemice generalizate. Deși datele clinice pot sugera IBR, semnele respiratorii patologice nu sunt limitate la IBR. Astfel, este necesară confirmarea de laborator pentru a identifica definitiv infecția cu BHV-1. Confirmarea expunerii la infecție naturală cu BHV-1 este facilitată prin măsurarea anticorpilor din ser sau lapte.

S-a aratat că testul imunoenzimatic (ELISA) pentru detecția anticorpilor anti-BHV-1 la bovine se corelează cu testul de virus neutralizare (VN), deși primul poate fi mai sensibil.

Descriere/principii

Testul IDEXX HerdCheck IBR gB este un test imunoenzimatic destinat detecției prezenței anticorpilor anti IBR în probe de ser sau lapte bovin. În plus, acest test ELISA detectează răspunsul în anticorpi indus de vaccinuri marker anti IBR care conțin glicoproteina B (gB). A fost configurat un format de titrare în microplacă prin imobilizarea antigenelor virale IBR pe placă. În urma incubării probei de testat în placa căptușită cu antigene, anticorpii anti IBR formează un complex cu antigenele virale imobilizate. După spălarea materialelor nelegate în godeuri, se adaugă un conjugat, anticorp monoclonal anti IBR gB cuplat cu peroxidază care nu se va lega la antigenul BHV-1 în cazul în care determinanții antigenici recunoscuți de anticorpurile monoclonale au fost ocupați (blocați) de anticorpii din proba de testat.

Ulterior, conjugatul nelegat este îndepărtat prin spălare și se adaugă o soluție de substrat/cromogen. În prezența enzimei, substratul este transformat într-un produs care reacționează cu cromogenul și generează o culoare albastră. La adăugarea soluției de spălare, apare o culoare galbenă.

Se masoară absorbanta la o lungime de undă unică de 450 nm (A450 nm) sau cu lungime de undă duală, la 450 și 650 nm (A 450/650 nm).

Procentul de blocare al probelor este calculat utilizând absorbanta A450 nm sau A 450/650 nm a probei de testat în raport cu absorbanta unui ser negativ de control.



Reagenți

Păstrați toți reagenții la 2-8°C.

	Volum	Volum
1 Plăci/stripuri căptușite cu antigen IBR	5 plăci	30 plăci
2 Ser pozitiv de control IBR	2 ml	6,5 ml
3 Ser de Control negativ IBR	2 ml	6,5 ml
4 Conjugat anticorp monoclonal anti IBR gB cuplat cu peroxidază	60 ml	350 ml
A Soluție de spălare concentrată (10 x)	480 ml	3 x 480 ml
B Soluție substrat TMB/H ₂ O ₂	60 ml	315 ml
C Soluție de Stopare	60 ml	315 ml

Materiale necesare dar nefurnizate

- Pipete automate de 10 µl până la 1000 µl.
- Vârfuri de pipetă de unica folosință
- Cilindru gradat de 500 ml
- Cititor microplăci
- Apă distilată sau deionizată
- Flacon de spălare sau spălător automat de plăci
- Pompă de vid , capcană aspirare și dezinfectant
- Cameră umedă sau sigiliu pentru plăci
- Vortex
- Centrifugă cu tuburi, capacitate 2000xg

Precauții

- Manipulați materialele biologice IBR ca și cum ar putea transmite boala.
- Nu pipetați cu gura
- Nu mâncați, nu beți și nu fumați în locul unde se manipulează reagenții.
- Soluția TMB poate fi iritantă pentru piele
- Soluția de stopare conține HCl 1M și poate provoca arsuri
- Nu expuneți soluția TMB la lumină puternică sau la agenți oxidanți. Manipulați soluția în flacoane curate din plastic sau sticlă.
- Păstrați reagenții din kit la +2°C- +8°C. Aduceți la temperatura camerei înainte de utilizare și apoi la +2°C- +8°C după utilizare.
- Toate reziduurile trebuie decontaminate corespunzător înainte de a fi aruncate.
- Trebuie să se evite contaminarea componentelor kit-ului.
- Nu utilizați componente expirate și nu amestecați reagenții sau instrucțiunile de lucru ale truselor din loturi diferite.
- Rezultate optime se obțin în condițiile respectării instrucțiunilor de lucru. Pipetarea cu grijă, cronometrarea și spălarea respectând protocolul sunt necesare pentru menținerea preciziei și acurateței
- Cele doua controale se vor utiliza la fiecare testare
- Utilizați doar apă distilată sau deionizată pentru prepararea reagenților utilizați în testare
- Stripurile nefolosite se vor păstra în pungi sigilate la temperatura de +2°C- +8°C
- De uz veterinar exclusiv



Prepararea probelor

Prepararea soluției de spălare

Soluția de spălare concentrată 10x trebuie adusă la temperatura camerei și amestecată pentru a asigura dizolvarea eventualelor săruri precipitate. Soluția concentrată 10x trebuie diluată 1:10 în apă distilată/deionizată. Exemplu : 30 ml soluție concentrată de spălare cu 270 ml apă distilată pe placă. Soluția de spălare diluată poate fi pastrată la frigider timp de o săptămână la +2°C- +8°C.

Prepararea probelor

Se pot testa probe de ser sau plasmă proaspete, răcite sau congelate în prealabil.

Probele de lapte integral se utilizează după centrifugare 15 minute la 2000xg sau după ce au fost lăsate la +2°C- +8°C peste noapte.

Pentru laptele degresat nu este necesar un tratament prealabil.

Schimbați vârful pentru fiecare probă și înregistrați poziția sa pe placă.

Procedura de lucru

Toți reagenții trebuie echilibrați la temperatura camerei (+18°C până la 25°C) înainte de utilizare. Reagenții se amestecă prin rotire ușoară sau prin agitare.

Probe ser/plasma

1. Scoateți placa (plăcile) căptușită cu antigen și înregistrați poziția probelor pe placă.
2. Adăugați 50 µl Soluție de Spălare reconstituită în toate godeurile.
3. Adăugați 50 µl Control pozitiv în godeurile corespunzătoare.
4. Adăugați 50 µl Control negativ în godeurile corespunzătoare.
5. Adăugați 50 µl probă de ser sau plasmă în restul plăcii.
6. Amestecați conținutul godeurilor bătând ușor placa sau folosiți un agitator pentru microplăci.
7. Incubați placa sigilată la +37°C timp de 2 ore sau peste noapte (12-18 ore) la 2-8°C (în frigider). Pentru rezultate bune, plăcile se vor sigila cu folii sau capace pentru evitarea evaporării.

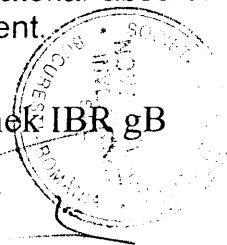
Probe de lapte

1. Scoateți placa (plăcile) căptușită cu antigen și înregistrați poziția probelor pe placă.
2. Adăugați 100 µl Control pozitiv în godeurile corespunzătoare.
3. Adăugați 100 µl Control negativ în godeurile corespunzătoare.
4. Adăugați 100 µl probă de lapte degresat într-un godeu sau două godeuri pe restul plăcii. Utilizați vârful diferite pentru fiecare probă.
5. Incubați placa sigilată peste noapte (12-18 ore) la 2-8°C (în frigider). Plăcile trebuie să fie sigilate bine pentru a evita evaporarea. Urmează etapa 8.

Procedură comună pentru probele de ser, plasmă și lapte

Aspirati conținutul godeurilor în rezervorul de deseuri corespunzător.

8. Aspirati conținutul godeurilor într-un rezervor
9. Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300µl soluție de spălare de 5 ori. Aspirati lichidul din godeuri după fiecare spălare. După ultima etapă de aspirare, bateți placa bine pentru a îndepărta ultimele urme de lichid pe un material absorbant. Evitați uscarea plăcii între spălări și adăugarea următorului reagent.



10. Adăugați 100μl de conjugat anticorp monoclonal anti IBR- HRPO în fiecare godeu.
11. Incubați 1 oră la temperatura camerei (+18°C ÷+ 25°C)
12. Repetați etapele 8 și 9.
13. Adăugați 100μl Soluție substrat în fiecare godeu.
14. Incubați 10 minute la temperatura camerei. Începeți cronometrarea după umplerea primului godeu.
15. Adăugați 100 μl Soluție de Stopare în fiecare godeu. Adăugați soluția de stopare în aceeași ordine în care ați adăugat soluția substrat în etapa 13.
16. Faceți Blanc față de aer.
17. Citiți absorbanta probelor și a controalelor la 450 nm sau cu lungime de undă duală la 450 și 650nm.
18. Calculați rezultatele.

Rezultate

Pentru ca testul să fie valid $OD_{NEG} \geq 0.500$, iar procentul de blocare pentru martorul pozitiv să fie mai mare de 80%. Prezența sau absența anticorpilor IBR gB este determinată din procentajul de blocare pentru fiecare probă.

NOTĂ: IDEXX deține aparatura și soft-ul potrivite pentru calculul mediilor și a procentajului de blocare.

Calcul

Calculați valoarea medie a Controlului negativ ($=OD_{NEG}$).

$$\text{Medie } OD_{NEG} = \frac{OD_{NEG} 1A_{450} + OD_{NEG} 2A_{450}}{2}$$

Calculați valoarea medie a Controlului pozitiv ($=OD_{POZ}$)

$$\text{Medie } OD_{POZ} = \frac{OD_{POZ} 1A_{450} + OD_{POZ} 4A_{450}}{2}$$

Calculați procentul de blocare al fiecărei probe de testat și cea a Controlului pozitiv conform formulei următoare

$$\text{Blocare\%} = \frac{OD_{NEG} - OD_{TEST}}{OD_{NEG}} \times 100$$

Interpretarea rezultatelor

1. Probele de lapte și ser/plasmă având procent de blocare mai mic decât 45% se consideră negative pentru anticorpi IBR
2. Probele de lapte și ser/plasmă având procent de blocare mai mare sau egal cu 45% dar mai mic decât 55% se consideră suspecte și trebuie retestate.
3. Probele de lapte și ser/plasmă având procent de blocare 55% sau mai mare se considera pozitive pentru anticorpi IBR.

PROCEDURA DE LUCRU - REZUMAT

IDEXX recomandă să fie citite instrucțiunile de lucru înainte de a efectua acest test pentru prima oară.

ETAPA	ACȚIUNE
1. PREPARAREA ȘI DISTRIBUIREA PROBELOR	Probe de ser sau plasmă • Scoateți placa (plăcile) căptușită cu antigen înregistrați poziția probelor pe placă. • Adăugați 50 μl Soluție de Spălare reconstituită în toate godeurile. • Adăugați 50 μl Control pozitiv în godeuri corespunzătoare. • Adăugați 50 μl Control negativ în godeuri corespunzătoare. • Adăugați 50 μl probă de ser sau plasmă în restul plăcii. • Amestecați conținutul godeurilor bătând ușor placa sau folosiți un agitator pentru microplăci Probe de lapte • Scoateți placa (plăcile) căptușită cu antigen înregistrați poziția probelor pe placă. • Adăugați 100 μl Control pozitiv în godeuri corespunzătoare. • Adăugați 100 μl Control negativ în godeuri corespunzătoare. • Adăugați 100 μl probă de lapte degresat într-un godeu sau două godeuri pe restul plăcii. Utilizați vârfuri diferite pentru fiecare probă.
2. INCUBAREA PROBELOR	Probe de ser sau plasmă • Incubați la +37°C timp de 2 ore sau peste noapte (12-18 ore) la 2-8°C (în frigider). Plăcile trebuie să fie sigilate bine pentru a evita evaporarea sau incubați în cameră umedă Probe de lapte • Incubați peste noapte (12-18 ore) la 2-8°C (în frigider). Plăcile trebuie să fie sigilate bine pentru a evita evaporarea sau incubați în cameră umedă
3. SPĂLAREA PLĂCII	• Aspirați conținutul godeurilor într-un rezervor • Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300μl soluție de spălare de 5 ori. Aspirați lichidul din godeuri după fiecare spălare. După ultima etapă de aspirare, bateți placa bine pentru a îndepărta ultimele urme de lichid pe un material absorbant
4. ADAUGAREA CONJUGATULUI	• Adăugați 100μl de conjugat anticorp monoclonal anti IBR- HRPO în fiecare godeu.
5. INCUBAREA PLACII CU CONJUGAT	• Incubați 1 oră la temperatura camerei (+18°C – +25°C)
6. REPETAREA ETAPEI 3	
7. ADAUGAREA SUBSTRATULUI	• Adăugați 100μl Soluție substrat în fiecare godeu
8. INCUBAREA PLACII CU SUBSTRAT	• Incubați 10 minute la temperatura camerei

	evitînd lumina directă. Începeți cronometrarea după umplerea primului godeu		
9. STOPAREA REACTIEI	Adăugați 100 µl Soluție de Stopare în fiecare godeu. Adăugați soluția de stopare în aceeași ordine în care ați adăugat soluția substrat în etapa 7		
10. CITIREA PLACII	- Faceți Blanc față de aer. - Citiți absorbanta probelor și a controalelor la 450 nm sau cu lungime de undă duală la 450 și 650nm. - Calculați rezultatele.		
13. INTERPRETARE Blocare% pentru probe de ser/plasmă și lapte	< 45%	≥45% până la < 55	≥ 55%
	negativ	suspect	pozitiv

Produs de
IDEXX Switzerland AG
Stationstrasse 12
3097 Liebfeld Bern, Switzerland

Suport tehnic
Contactati distribuitorul local IDEXX
Sau vizitați
www.idexx.com/production/contact
IDEXX Technical Support :00-800-727-43399

*HerdChek este marca înregistrată a IDEXX laboratories Inc., în Statele Unite și/sau alte state.