

Antigen Brucellic pentru Testul de Fixare a Complementului

Doar pentru uz veterinar

Nume si utilizare

Pourquier CFT Brucellosis Ag este un Antigen Brucelic IDEXX pentru diagnosticul Brucelozei utilizand reactia de fixare a complementului.

Descriere si principii

Pourquier CFT Brucellosis Ag foloseste reactia de fixare a complementului. Antigenul pentru testul de Fixare a Complementului este o suspensie concentrata de *Brucella abortus* (Tulpina s99 - Weybridge) inactivata termic si cu fenol. Testul de Fixare a Complementului este una dintre cele mai sensibile metode de diagnostic a Brucelozei. Este folosita deasemenea si o metoda de fixare la rece a tipului de reactia elaborata de Kolmer. Acest antigen permite diagnosticul serologic al Brucelozei (*Brucella melitensis, abortus, suis*). Acest antigen este standardizat astfel incat sa se obtina o fixare de 50% cu o dilutie finala 1:200 din Serul Standard International *Brucella abortus* (OIEISS).

Pourquier CFT Brucellosis Ag a fost dezvoltat in conformitate cu Standardul Francez AFNOR U47-004 (Detectia anticorpilor anti Bruceloza de catre Testul de Fixare a Complementului, Apr. 2009) si cu Cerinte aplicabile OIE si Europene.

Reactivi

Reactivi

Reactivi	Voluim
Antigen Brucelic pentru Testul de Fixare a Complementului (Concentrat)	100 ml

Nota: verificati tabelul de la sfarsitul prospectului pentru semnificatia simbolurilor utilizate.

Conservare

Pastrati toti reactivii feriti de lumina la 2-8° C. Nu congelati reactivii. Reactivii sunt stabili pana la data expirarii.

Materiale necesare dar nefurnizate in kit

- Tampon Veronal (disponibil la IDEXX)
- Control Pozitiv (disponibil la IDEXX)
- Complement liofilizat
- Hematii ovine la 50%
- Ser hemolizat standardizat
- Placi pentru distribuirea reagentilor si a probelor
- Micropipete de precizie si Pipete multicanal de precizie
- Varfuri de pipeta de unica folosinta
- Incubator capabil sa mentina o temperatura de +37°C (±3°C)
- Agitator de placi
- Baie de apa

Precautii si avertizari pentru utilizatori

- Utilizati materialele biologice ca si potientiale infectioase
- Utilizati ochelari, manusi si imbracaminte de protectie cand manipulati probele si reactivii
- Pentru informatii suplimentare verificati materialul cu privire la masurile de protectie din acest produs



Buna Practica de Laborator

- Rezultate optime se obtin daca se respecta protocolul de lucru .Pipetarea,timpii de lucru cat si etapele de spalare trebuie respectate pentru obtinerea de maxima precizie si acuratete a testuili
- Toate reziduurile se vor decontamina inainte de eliminare.Masurile de eliminare a deseurilor se lua in acord cu legislatia locala si nationala.
- Trebuie prevenita contaminarea componentelor .Nu refolositi reagentii neutilizati
- Nu utilizati reagentii expirati

Prepararea reagentilor

Complementul diluat

Reconstituiti Complementul liofilizat cu solvent cum a fost indicat.

Diluati 1:100 cu Tampon Veronal.

Tampon Veronal Diluat

Tamponul Veronal trebuie diluat 1:5 cu apa distilata.

Antigen Brucelic pentru Testul de Fixare a Complementului

Antigenul Brucelic concentrat trebuie diluat chiar inainte de utilizare in apa salina (8.5 g/l), sau si mai bine cu tampon Veronal diluat, in concordanta cu factorul de concentratie indicat pe sticla de antigen.

Titarea Complementului (in tuburi)

Distribuiti complementul reconstituit "C" diluat 1:100, tamponul Veronal diluat "Vb", antigenul Brucelic diluat "Ag" si cuplul Hemolitic "Hc" conform urmatorului tabel:

ID tub	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	H0	H100
C (ml)	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16	0	0.40
Vb (ml)	0.36	0.35	0.34	0.33	0.32	0.31	0.30	0.29	0.28	0.27	0.26	0.25	0.24	0.40	0
Ag (ml)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Agitati tuburile, plasati-le in baia de apa la 37°C (±3°C) pentru 30 min. (±2 min.)															
Hc (ml)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Agitati tuburile, plasati-le in baia de apa la 37°C (±3°C) pentru 30 min. (±2 min.)															

Hematii de Oaie la 2.5%

Amestecati 0.5 ml de hematii la 50% si 9.5 ml de tampon Veronal diluat.

Cuplul Hemolitic

Titarea Complementului si Testul de fixare a complementului trebuie imperativ realizate cu aceleasi elemente ale cuplului hemolitic.

Se prepară un volum suficient de produse pentru aceste 2-utilizări.

Depozitati-le separat între utilizări.

- Amestecă în proporții echivalente celulele roșii din sânge de oaie preparate la 2,5% (a se vedea mai sus) și serul hemolitic standardizat conținând 2 UI / ICFTU (diluat în conformitate cu titrul indicat).
- Se amestecă cantitățile necesare pentru fixarea complementului 20 de minute (± 2 min.) înainte de utilizare și se lasă la 18-26°C (vezi tabelul de mai jos pentru cantitățile necesare). Produsele rămase trebuie să fie depozitate separat la 2-8°C până a doua zi.
- Scoateți tuburile de la baia de apă și se centrifughează imediat timp de 10 minute (± 2 min.) la 500-1000 g.

Controlul Hemolitic H50

Se prepară un control H50: se amestecă 0,50 ml de supernatant H0 control hemolitic cu 0,50 ml de H100 supernatant de control hemolitic. Primul tub cu un supernatant care prezintă aceeași culoare cu acest control H50 se va numi unitate H50.



Cantitatea de Complement necesar pentru reactie:

Exemplu: Numărul de godeuri = 100

$$\frac{80 \times 6 \times 100 \times 25}{100 \times 200} = 60 \mu\text{L de Complement ce trebuie mai departe diluat cu} \\ 2440 \mu\text{L de tampon Veronal}$$

25 μL de complement diluat sunt distribuite în fiecare godeu:

25 $\mu\text{L} \times 100 = 2,5 \text{ ml}$ (volumul total de complement pentru a fi preparat)

Unitatea H50 a fost găsită pentru tubul nr.5 (80 μL de complement la 1: 100).

Testul folosește 6 unități H50:

Testul se va efectua în tuburi (macrometoda) sau în microplaci (micrometoda)

Prepararea probelor

Inactivați serul pentru a fi titrat într-o baie de apă la 59°C ($\pm 1^\circ \text{C}$) timp de 30 de minute ($\pm 2 \text{ min.}$).

Diluati-le cu tampon Veronal diluat ("Vb") (în tuburi sau microplăci).

Test efectuat în tuburi

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Sample (μL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Vb (μL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Test efectuat în microplaci

Dilution	TS	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Sample (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Vb (μL)	75	25	25	25	25	25	25	25	25

Discard 25 μL

Procedura de lucru

Utilizați varfuri pentru pipete separate pentru fiecare probă.

1. Distribuiți proba ("S"), Antigenul brucelic diluat ("Ag"), Complementul diluat ("C") și tamponul Veronal ("Vb") conform tabelului următor:

Test efectuat în tuburi:

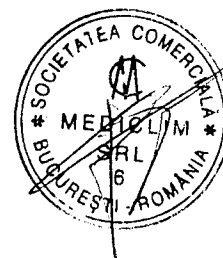
Dilution	S	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	T Ag	TC	TGR	TS
s (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/	/	25
Ag (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/	/
C (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	25
Vb (μL)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	25	50	75	25

Test efectuat în microplaci

Dilution	TS	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	T Ag	TC	TGR
s (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/	/
Ag (μL)	/	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/
C (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/
Vb (μL)	25	/	/	/	/	/	/	/	/	25	50	75

T Ag=Antigen Control /TC= Control Complement /TGR =Hematii de Control/TS=Ser de Control

2. Agitați placile folosind un agitator de microplaci.
3. Acoperiți placile.
4. Incubați 16-20 de ore la 2-8°C
5. Țineți cuplul hemolitic (preparat cu o zi înainte-vedeți la prepararea reagenților) la 18-26°C pentru 10 minute ($\pm 2 \text{ min.}$).
6. În paralel:
 - a. Incubați placile la 37°C ($\pm 3^\circ \text{C}$) pentru 10 min ($\pm 2 \text{ min.}$)



- d. Mentineti cuplul hemolitic la 18-26°C pentru inca 10 minute (± 2 min.)
7. Adaugati 50 μ L de cuplu hemolitic in fiecare godeu.
 8. Agitati placile si acoperiti placile.
 9. Incubati placile la 37°C ($\pm 3^\circ$ C) pentru 30 min (± 2 min)
 10. Centrifugati placile (500-1000 g) la 2-8°C pentru 10 min (± 2 min) sau lasatile la 2-8°C pentru 60 min (± 5 min).
 11. Calculul.

Controalele

Evaluati supernatantul conform controalelor preparate dupa cum urmeaza:

	0	+	++	+++	++++
Veronal buffer (μ L)	0	25	50	75	100
Total haemolysis well (μ L) = Complement Control	100	75	50	25	0

In fiecare godeu, rata hemolizarii celulelor rosii sensibilizate este notata dupa cum urmeaza:

- ++++ = Inhibitie totala a hemolizarii
- +++ = Inhibitie de 75% a hemolizarii (=25% hemoliza)
- ++ = Inhibitie de 50% a hemolizarii (=50% hemoliza)
- + = Inhibitie de 25% a hemolizarii (=75% hemoliza)
- 0 = Hemoliza completa

Criterii de validare

Testul se considera validat daca:

- Antigenul de Control (TAg) : 100% hemoliza
- Complementul de Control (T C) : 100% hemoliza
- Hematii de Control : 0% hemoliza
- Serul Negativ de Control : 100% hemoliza
- Serul Pozitiv de Control : s-a reprodus la titrul asteptat (+/_ o dilutie)

Interpretarea rezultatelor

- < 50% pentru inhibitia hemolizarii la $\frac{1}{4}$ = negativ
- $\geq 50\%$ pentru inhibitia hemolizarii la $\frac{1}{4}$ = pozitiv

Correspondenta intre dilutia serului si a unitatilor Internationale ICFTU a Complementului de fixare per mililitru (Pragul de pozitivitate = 20 UI/ml (ICFTU/ml)):

Dilutia Probelor	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
IU/ml (ICFTU/ml)	10	20	40	80	160

Pentru suport tehnic contactati distribuitorul local.



Eticheta limba engleza

REF P00120

Pourquler *
CFT Brucellosis Ag

100ml

For veterinary use only.
Réservé à l'usage vétérinaire.
Für Tiere

IVD

i

Shake before use.
Agiter avant utilisation.
Agitar antes de usar.
Agitar antes de usar.
Vor Gebrauch schütteln.

IDEXX

LOT SN



ZUL.-Nr.:
BFAV-B 371



IDEXX Montpellier SAS, 326 rue de la Galéra, 34090 Montpellier, FR
Tel: +33 4 99 23 24 25

EC REP

IDEXX Europe B V, P.O. Box 1334, 2130 EK Hooftdorp, NL
Tel: +800 727 43399

Eticheta limba romana

REF P00120

Pourquler *
CFT Brucellosis Ag

100ml

De uz veterinar exclusiv.

IVD

i

Agitați înainte de
utilizare

IDEXX

LOT SN



ZUL.-Nr.:
BFAV-B 371



IDEXX Montpellier SAS, 326 rue de la Galéra, 34090 Montpellier, Franta
Tel: +33 4 99 23 24 25

EC REP

IDEXX Europe B V, P.O. Box 1334, 2130 EK Hooftdorp, Olanda
Tel: +800 727 43399

