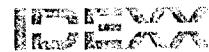


Diagnosticul serologic al Leucozei Enzootice Bovine prin metoda ELISA

Test with confidence*



IDEXX Leucoză Ser Screening
P02110-14

Diagnosticul serologic al Leucozei Enzootice Bovine prin metoda ELISA

Denumire și utilizare

De uz veterinary exclusiv

IDEXX Leucoză enzootică bovină este o tehnică imunologică enzimatică pentru detecția anticorpilor anti-virusul leucozei enzootice bovine (BLV) în probe de ser individual sau plasmă de bovine și amestecuri de seruri de bovine (maxim 10).

Informații generale

Leucoza enzootică bovină este o boală infecțioasă limfoproliferativă a bovinelor răspândită în întreaga lume. Boala este cauzată de un delta-retrovirus exogen, virusul leucozei bovine (BLV) care induce o infecție persistentă a unei sub-populații de limfocite prin integrarea ADN-ului viral în mai multe zone ale ADN-ului celular. Majoritatea bovinelor infectate rămân sănătoase chiar dacă 30% dezvoltă limfocitoză persistentă și o parte mică (până la 10%) dezvoltă tumori limfoide. Boala afectează mai ales fermele de lapte și se răspândește predominant pe cale orizontală prin sânge sau secreții ce conțin limfocite infectate.

Deoarece nu există nici un tratament sau vaccin, programele de eradicare sunt bazate pe identificarea și eliminarea animalelor infectate. Aceasta se realizează mai ales prin detectarea anticorpilor anti viral. Bovinele infectate aduc anticorpi specifici față de proteinele virale majore chiar în stadiile precoce ale infecției. Inițial, pentru detectarea anticorpilor față de glicoproteina de suprafață gp51, s-a folosit testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA). Cu toate acestea, sensibilitatea testului IDGA s-a dovedit a fi redusă și s-au raportat cazuri de animale infectate ai căror anticorpi nu au putut fi identificați prin ID. Din aceste motive, metoda ELISA, care este simplă, rapidă și mai ales sensibilă, este utilizată pentru supravegherea cirezilor.

Acest test este destinat detecției anticorpilor specifici virusului leucozei enzootice bovine (BLV) în probe de ser individual sau plasmă de la bovine și amestecuri de seruri de bovine (maxim 10).

Descriere și principiu

Microplăcile sunt căptușite cu antigen BLV. Probele de testat sunt diluate și incubate în godeuri. În timpul incubării probelor în godeurile căptușite, anticorpii specifici BLV formează complexe imune cu antigenele BLV. După spălarea materialului nelegat, se adaugă conjugatul enzimatic, un anticorp anti-bovine, care se leagă la orice complex imun anticorp-antigen. Conjugatul nelegat este spălat și se adaugă substratul (TMB). În prezența enzimei, substratul este oxidat și dezvoltă un compus albastru care devine galben după blocare. Culoarea dezvoltată este direct proporțională cu cantitatea de anticorpi BLV prezenti în proba de testat.

Relevanța diagnosticului rezultatului este obținută prin compararea densității optice a probei cu media densității optice a controlului pozitiv (vezi "Calcule" și "Interpretarea rezultatelor").

Reagenți

Păstrați toți reagenții la 2-8°C.

Reagenți		Volume	
1	Plăci căptușite cu antigen BLV	5	10
2	Control pozitiv	1ml	1ml
3	Control negativ	1ml	1ml
4a	Conjugat concentrat (IgG anti-bovine HRPO)	1,5ml	1,5ml
4b	Tampon de diluție N.1	120ml	120ml
5	Tampon de diluție N.2	120ml	2x120ml
A	Substrat TMB N.13	60ml	120ml
B	Soluție de stopare	60ml	120ml
C	Soluție de spălare concentrată (20x)	100ml	2x100ml

Notă : vezi tabelul de la pag.32 pentru descrierea simbolurilor internaționale utilizate pe etichetele setului.

Materiale necesare dar nefurnizate

- Centrifugă (capacitate 2000xg)
- Micropipete de precizie și multicanal (volumele reagenților listate în “Protocolul de testare” necesită pipete de precizie de $\pm 5\%$)
- Conuri de micropipete uzaj zilnic
- Agitator de microplăci
- Apă distilată sau deionizată
- Spălător de microplăci (sistem manual, semi-automat sau automat)
- Capace de microplăci (folie de aluminiu sau folie adezivă)
- Cititor de microplăci cu 96 de godeuri echipat cu filtru de 450nm
- Cameră umedă/Incubator capabil să mențină o temperatură de +37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)

Precauții la utilizare

- Nu pipetați reactivii cu gura
- Purtați mănuși de protecție/echipament de protecție/ochelari de protecție/mască
- Controalele, substratul și soluția de spălare concentrată pot provoca iritații ale ochilor
- Soluția de stopare poate provoca arsuri severe ale pielii și ochilor
- Toate deșeurile trebuie decontaminate corespunzător înainte de eliminare. Eliminați conținutul conform legislației locale, regionale și naționale.

Prepararea reagenților

Controalele și probele

Diluția probelor și a controalelor depinde de protocolul de incubare selectat:

- Protocolul scurt (1 oră (± 5 min) la 37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)): controalele și probele se diluează direct în placă, așa cum este descris în etapa 1 a protocolului de testare.
- Protocolul peste noapte (16-24 ore la 2-8°C): pre-diluați controalele negativ și pozitiv și probele 1:50 cu tampon de diluție N.2.

Soluția de spălare

Soluția de spălare concentrată (20x) trebuie să fie diluată 1:20 cu apă distilată /deionizată înainte de utilizare (ex. 15ml soluție de spălare concentrată (20x) în 285ml apă distilată). Această soluție este de acum numită „Soluție de spălare”.

Notă: Soluția de spălare concentrată trebuie adusă la 18-26°C și agitată bine pentru dizolvarea oricăror săruri precipitate. Soluția de spălare este stabilă până la 3 zile păstrată la 2-8°C.

Conjugatul

Conjugatul concentrat trebuie diluat 1:100 în tampon de diluție N.1

Notă: Conjugatul diluat este stabil până la 8 ore la 18-26°C.

Protocolul de testare

Toți reagenții trebuie aduși la 18-26°C înainte de utilizare.

Reagenții trebuie agitați prin învărtire ușoară sau vortexare. Utilizați vârfuri separate pentru fiecare probă. Controalele pot fi distribuite oriunde în microplacă. Înregistrați poziția fiecărei probe pe foaia de lucru.

1. Distribuția probelor și a controalelor depinde de protocolul de incubare a probelor și controalelor:
 - Protocolul scurt: 1 oră ($\pm 5\text{min.}$) la 37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)
 - ✓ Distribuiți 190µL de tampon de diluie N.2 în fiecare godeu
 - ✓ Distribuiți 10 µL control negativ NEDILUAT în godeul corespunzător
 - ✓ Distribuiți 10µL control pozitiv NEDILUAT în cele două godeuri corespunzătoare
 - ✓ Distribuiți 10 µL probe NEDILUATE în godeurile rămase
 - ✓ Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci
 - ✓ Acoperiți microplacă (cu un capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați 1 oră ($\pm 5\text{min.}$) la 37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)
 - Protocolul peste noapte: 16-24 ore la 2-8°C
 - ✓ Distribuiți 200µL control negativ DILUAT în godeul corespunzător
 - ✓ Distribuiți 200 µL control pozitiv DILUAT în cele două godeuri corespunzătoare
 - ✓ Distribuiți 200 µL probă DILUATĂ în godeurile rămase
 - ✓ Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci
 - ✓ Acoperiți microplacă (cu un capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați 16-24 ore la 2-8°C.
2. Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300 µL soluție de spălare de trei ori. Aspirați conținutul lichid din toate godeurile după fiecare spălare. După aspirația finală, bateți placă de fluidul rezidual din fiecare microplacă pe un material absorbant. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent.
 3. Distribuiți 100 µL conjugat diluat în fiecare godeu.
 4. Acoperiți microplacă (cu un capac, folie de aluminiu sau capac adeziv) și incubați timp de 30 minute ($\pm 3\text{min.}$) la 37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$).
 5. Repetați pasul 2.
 6. Distribuiți 100 µL substrat N.13 în fiecare godeu.
 7. Incubați 20 minute ($\pm 3\text{min.}$) la 18-26°C la întuneric.
 8. Distribuiți 100 µL de soluție de stopare N.3 în fiecare godeu. Agitați placă prin scuturare ușoară. Ștergeți cu grijă fundul plăcii.
 9. Citiți față de aer.
 10. Măsurați și înregistrați valorile densităților optice ale probelor și controalelor la 450nm
 11. Calculați rezultatele.

Notă: Când utilizati robotică, incubarea microplăcilor în camera umedă se poate face fără să acoperiți placă. Utilizarea robotilor nu este compatibilă cu agitarea ușoară sau ștergerea plăcilor. Plăcile pot fi ținute până la 1 oră la întuneric înainte de citire.

Rezultate

Pentru validarea încercării, media densității optice a controlului pozitiv (CPx) trebuie să fie mai mare sau egală cu 0.350 .

În plus, raportul dintre media controlului pozitiv (CPx) și controlul negativ (CNA₄₅₀) trebuie să fie mai mare sau egal cu 3.00.

Notă: IDEXX deține instrumentele și software potrivit pentru calcularea mediilor și furnizarea sumarului datelor.

Calcule

Calcularea mediei controlului pozitiv
(CPx)

$$CPx = \frac{CP1A_{450} + CP2A_{450}}{2}$$

Calcularea procentajului probelor S/P (%)

$$\%S / P = \frac{DO_{450} proba}{DO_{450} CPx} \times 100$$

Interpretarea rezultatelor

- Orice probă (ser individual sau amestec de seruri) a cărui **S/P% este inferior sau egal cu 100%** va fi considerată ca provenind de la o bovină (sau un grup de bovine) care nu a fost în contact cu virusul BLV.
- Orice probă (ser individual sau amestec de seruri) a cărui **S/P% este superior a 100%** va fi considerată ca provenind de la o bovină (sau un grup de bovine) care a fost în contact cu virusul BLV.

Sumarul procedurii de testare

IDEXX recomandă citirea cu atenție a instrucțiunilor înainte de utilizarea testului pentru prima dată.

Etape	Acțiune
1. Prepararea reagenților și a probelor	Diluția probelor și a controalelor depinde de protocolul de incubare selectat: <u>Protocolul scurt (1 oră (\pm 5 min) la 37°C (\pm 3°C)):</u> controalele și probele se diluează direct în placă, așa cum este descris în etapa 1. Protocolul peste noapte (16-24 ore la 2-8°C): pre-diluă controalele negativ și pozitiv și probele 1:50 cu tampon de diluție N.2. <u>Solutia de spălare</u> Soluția de spălare concentrată (20x) trebuie să fie diluată 1:20 cu apă distilată /deionizată înainte de utilizare (ex. 15ml soluție de spălare concentrată (20x) în 285ml apă distilată). <u>Conjugatul</u> Conjugatul concentrat trebuie diluat 1:100 în tampon de diluție N.1
2. Distribuția și incubarea probelor	Protocolul scurt: 1 oră (\pm 5min.) la 37°C (\pm 3°C) Distribuiți 190µL de tampon de diluție N.2 în fiecare godeu Distribuiți 10 µL control negativ NEDILUAT în godeul corespunzător Distribuiți 10µL control pozitiv NEDILUAT în cele două godeuri corespunzătoare Distribuiți 10 µL probe NEDILUATE în godeurile rămase Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci Acoperiți microplaca (cu un capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați 1 oră (\pm 5min.) la 37°C (\pm 3°C) <u>Protocolul peste noapte: 16-24 ore la 2-8°C</u> Distribuiți 200µL control negativ DILUAT în godeul corespunzător Distribuiți 200 µL control pozitiv DILUAT în cele două godeuri corespunzătoare Distribuiți 200 µL probă DILUATĂ în godeurile rămase Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci Acoperiți microplaca și incubați 16-24 ore la 2-8°C.
3. Spălarea plăcii	Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300 µL soluție de spălare de trei ori
4. Distribuirea conjugatului	Distribuiți 100 µL conjugat diluat în fiecare godeu
5. Incubarea conjugatului	Acoperiți microplaca și incubați timp de 30 minute (\pm 3min.) la 37°C (\pm 3°C).
6. Repetați pasul 3	
7. Distribuirea substratului	Distribuiți 100 µL substrat N.13 în fiecare godeu
8. Incubarea substratului	Incubați 20 minute (\pm 3min.) la 18-26°C la întuneric
9. Stoparea reacției	Distribuiți 100 µL de soluție de stopare N.3 în fiecare godeu
10. Citirea plăcii	Citiți față de aer. Măsurăți și înregistrați valorile densităților optice ale probelor și controalelor la 450nm. Calculați rezultatele
11. Interpretarea	Orice probă (ser individual sau amestec de seruri) a cărui S/P% este inferior sau egal cu 100% va fi considerată ca provenind de la o bovină (sau un grup de bovine) care nu a fost în contact cu virusul BLV. Orice probă (ser individual sau amestec de seruri) a cărui S/P% este superior a 100% va fi considerată ca provenind de la o bovină (sau un grup de bovine) care a fost în contact cu virusul BLV

Producător:

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galera – Parc Euromedicine
34090 Montpellier, Franța

*IDEXX și Test With Confidence sunt marcă înregistrată a IDEXX Laboratories, Inc., sau a afiliatorilor sale din Statele Unite și/sau alte țări

Pentru asistență tehnică:

Contactați managerul sau distribuitorul IDEXX apropiat sau vizitați: www.idexx.com/production/contact

Supor tehnic IDEXX: 00-800-727-43399

ROZETTE

IDEXX Leukosis Serum Screening

Kit de detecție a
anticorpilor virusului
Leucozei Enzootice
Bovine (LEB)

IDEXX Leucoză Ser Screening
10 x 96 godeuri

LEO SER

Kit de detecție a anticorpilor dirijați contra virusului Leucozei
Enzootice Bovine (LEB)

IDEXX Leucoză Ser Screening
Pentru utilizare cu seruri și plasmă de bovine
Notă: Exclusiv de uz veterinar

Reagenți	Cantități
1. Plăci căptușite cu antigen LEB	10
2. Control pozitiv	1 x 1ml
3. Control negativ	1 x 1ml
4a. Conjugat concentrat	1 x 1,5ml
4b. Tampon de diluție N 1	1 x 120ml
5. Tampon de diluție N 2	2 x 120ml
A. Substrat TMB N.13	1 x 120ml
B. Soluție de stopare N.3	1 x 120ml
C. Soluție de spălare concentrată (20x)	2 x 100ml

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galerie, 34090
Montpellier, Franța
Tel. +33 (0)4 99 23 24 25
Fax +33 (0)4 67 04 20 25

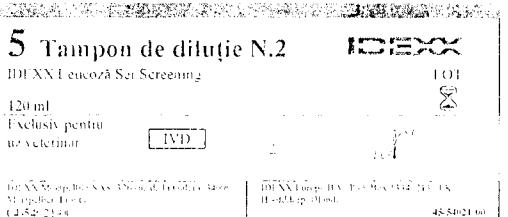
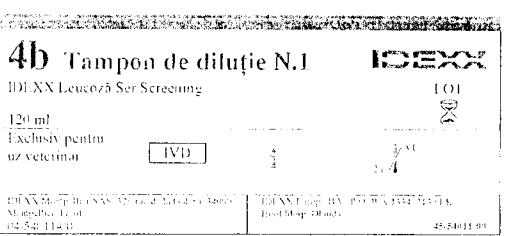
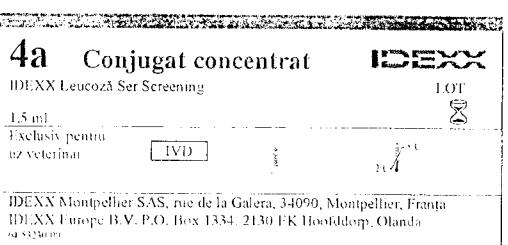
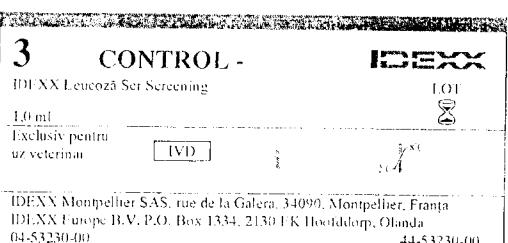
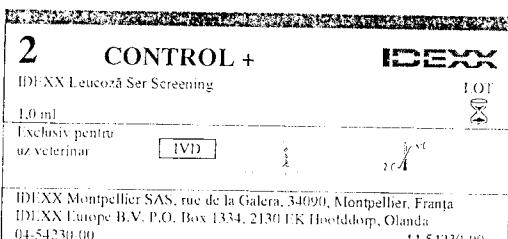
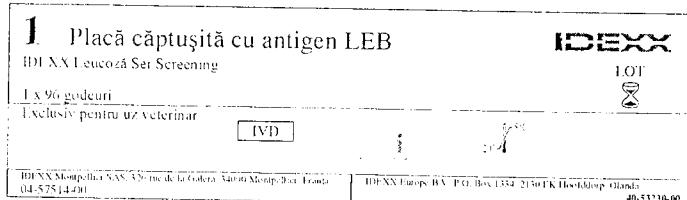
IDEXX Europa B.V.
PO Box. 1334, 2130 EK
Hoofddorp, Olanda
Tel. 00800-727-43399
Fax 00800-433-99329

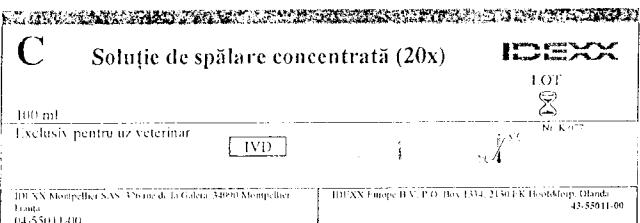
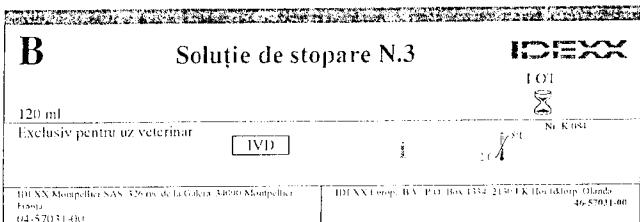
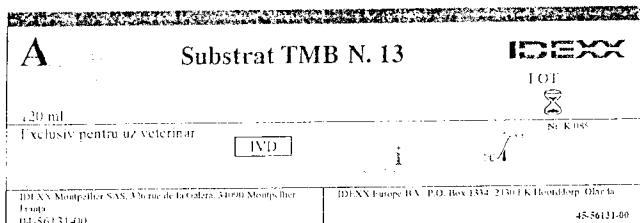
8°C

04-57319-00

P02110-10

IDEXX Leucoză Ser Screening





PP02110-5

IDEXX Leukosis Serum Screening

Kit de detecție a
anticorpilor virusului
Leucozei Enzootice
Bovine (LEB)

IDEXX Leucoză Ser Screening
5 x 96 godeuri

Kit de detecție a anticorpilor dirijați contra virusului Leucozei
Enzootice Bovine (LEB)

IDEXX Leucoză Ser Screening
Pentru utilizare cu seruri și plasmă de bovine
Notă: Exclusiv de uz veterinar

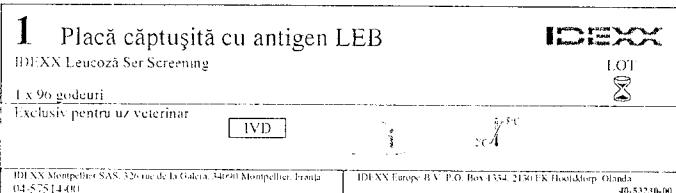
Reagenți	Cantități
1. Plăci căptușite cu antigen LEB	5
2. Control pozitiv	1 x 1ml
3. Control negativ	1 x 1ml
4a. Conjugat concentrat	1 x 1,5ml
4b. Tampon de diluție N.1	1 x 120ml
5. Tampon de diluție N.2	1 x 120ml
A. Substrat TMB N.13	1 x 120ml
B. Soluție de stopare N.3	1 x 120ml
C. Soluție de spălare concentrată (20x)	1 x 100ml

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galera, 34090
Montpellier, Franta
Tel. +33 (0)4 67 04 20 25
Fax +33 (0)4 67 04 20 25

IDEXX Europa B.V.
PO Box. 1334, 2130 EK
Hoofddorp, Olanda
Tel. 00800-727-43399
Fax 00800-433-99329

8°C

04-57319-00



P02110-5
IDEXX Leucoză Ser Screening

