

SERELISA® BLV Ab Mono Blocking

**KIT PENTRU DETECȚIA ANTICORPILOR ANTI-gp 51 AI
VIRUSULUI LEUCOZEI BOVINE ÎN PROBE DE SER
(INDIVIDUAL ȘI POOL-uri)**

TEHNICĂ IMUNOENZIMATICĂ DE BLOCARE

384 godeuri cu o singură reacție

I. PRINCIPIUL TESTULUI

Kitul "SERELISA® BLV Ab Mono Blocking" utilizează o metodă imunoenzimatică de blocare ce permite detecția anticorpilor anti-glicoproteinei structurale (gp 51) în probe de ser. Kitul permite detecțarea unei probe de ser pozitiv într-un pool de 10 seruri, conform cu reglementările Uniunii Europene. Reacția este compusă din trei pasi:

1. Fiecare probă de ser este plasată în godeul căptușit cu glicoproteina structurală (gp 51) a virusului LEB. Anticorpii anti gp 51 prezenti în probă se vor cupla cu antigenul glicoproteinei ce căptușește godeul.

2. După o etapă de spălare se adaugă un conjugat anticorp monoclonal anti-gp 51cuplat cu peroxidază. Se fixează la siturile libere ale gp 51 formând un complex:

(Ag gp 51) - (Anti Ac gp 51/ peroxidază)

3. Conjugatul în exces este eliminat printr-o etapă de spălare. Enzima cuplată la conjugat este evidențiată prin adăugarea unui substrat, ce se transformă într-un produs colorat. Densitățile optice corespunzătoare sunt măsurate și interpretate în funcție de valorile de cut-off obținute la martori de control.

- În absența anticorpilor din probă se va vedea o reacție de culoare intensă, datorită transformării conjugatului enzimatic legat la siturile libere ale gp 51, fixate de faza solidă.

- În prezența anticorpilor anti gp 51 din probă, mai puțin conjugat enzimatic se va lega de siturile gp 51 fixate de faza solidă și de aceea intensitatea reacției de culoare va fi diminuată.

II. COMPOZIȚIA ȘI CONSERVAREA KITULUI

| NATURA REAGENTULUI | RECONSTITUIRE ȘI CONSERVARE |
|--|--|
| 4 microplăci ce conțin 6 stripuri de 2 x 8 godeuri sensibilizate cu proteină gp 51 a virusului LEB | A se utiliza în maxim 4 săptămâni după deschiderea ambalajului, care trebuie să fie închis după utilizare. |
| Conjugat (CJ) Anticorpi monoclonali anti-gp51 / peroxidază (concentrat 10X) | Diluați de 100 ori în diluantul de conjugat și utilizați în max 2 h după diluție. |
| Substrat tamponat cu peroxidază (SP) | Gata de utilizat. |
| Martor de control negativ (N) | Gata de utilizat. |
| Martor de control pozitiv (P) | Gata de utilizat. |
| Diluant pentru probe (DP) | Gata de utilizat. |
| Soluție de spălare (W) (concentrat de 10X) | Diluați 1/10 în apă distilată sau demineralizată. Utilizați în max 5 zile după diluție. |
| Diluant pentru conjugat (DC) | Gata de utilizat. |
| Soluție de stopare (S) | Gata de utilizat. |
| Filme Adezive | 12 filme |

Notă: Păstrați reagenții diluați la +5°C ± 3°C și utilizați-i conform procedurii menționate mai sus.

III. MATERIALE ȘI REAGENȚI NECESARI (NU SUNT FURNIZAȚI)

- Apă distilată sau demineralizată.
- Pipete ajustabile sau fixe pentru a măsura și doza între 0 și 1000 µl. Deviația măsurătorii trebuie să fie ≤ 10% pentru volume ≤ 10 µl și ≤ 5% pentru toate celelalte volume.
- Cilindrii gradați (100 ml și 1000 ml).
- Spălător manual, automat sau semi-automat pentru plăcile de microtitrare.
- Cititor de microplăci, setat cu filtre bicromatice ce pot citi la 450 și 630 nm. Se poate utiliza și un cititor monocromatic setat pe filtru de 450 nm.
- Incubator la +37°C ± 3°C.

IV. PRECAUȚII PENTRU UTILIZARE

Calitatea rezultatelor depinde de respectarea regulilor și procedurilor bunei practici de laborator (vedeți paragraful VI).

1. Nu amestecați sau asociați reagenți din loturi cu numere diferite.
2. Nu utilizați reagenții după data expirării.
3. Aduceți reagenții la temperatura laboratorului cu cel puțin o oră înainte de utilizare.
4. Manipulați toți reagenții și probele ca materiale cu risc biologic.
5. Tineți toți reagenții departe de piele și ochi. Dacă apare expunerea, spălați imediat suprafețele afectate cu apă rece.
6. Nu pipetați niciodată cu gura.
7. Evitați contaminarea între probe în timpul recoltării, depozitării sau transportului probelor. Utilizați vârfuri de pipetă de unică folosință, separate pentru fiecare probă.
8. Evitați contaminarea soluției substrat cu ioni metalici, agenți de oxidare sau detergenți. Asigurați-vă că toți recipienții sunt curați. Nu utilizați același recipient sau același vârf de pipetă pentru conjugat și substrat.
9. Se recomandă ca eliminarea reagenților și a materialului contaminat să se facă în funcție de reglementările în vigoare. Fișele cu datele de securitate ale produsului sunt disponibile la cerere.

Fraze de risc:

R35: Cauzează arsuri grave.

S26: În cazul contactului cu ochii clătiți imediat cu apă din abundență și solicitați sfatul medicului.

S30: Niciodată nu adăugați apă peste produs.

S45: În caz de accident sau dacă nu vă simțiți bine, solicitați imediat sfatul medicului.

V. PROBE

Testul poate fi utilizat pe probe decantate individuale sau pool-uri de seruri (până la 10 probe de ser). Probele trebuie păstrate după cum urmează:

| Probe | Refrigerat (+ 5°C) | Congelat (- 20°C) | Temperatura lab. (23°C) |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| Seruri individuale sau pool | max. 7 zile | Da | Nu |

VI. PROCEDURĂ

Strict conform procedurilor indicate mai jos. Utilizați martori de control negativi și pozitivi în duplicat pentru fiecare testare, pentru fiecare placă.

A. ETAPE PRELIMINARE

1 – Setați cu atenție distribuirea și identificarea martorilor și probelor.

2 – Preparați probele ce vor fi testate: se poate folosi diluția 1:10 fie înainte în tuburi de hemoliză, microplăci blank, și direct în godeurile de testare.

B. PROCEDURA DE TESTARE

I - DISTRIBUIREA MARTORILOR DE CONTROL ȘI A PROBELOR

1. Distribuirea martorilor de control:



Martorii de control sunt gata de utilizare.

După agitarea flacoanelor, adăugați 100 µl de martor de control negativ (N) în godeurile A1 și A2 și 100 µl de martor de control pozitiv (P) în godeurile B1 și B2.

2. Distribuirea probelor:

Plasați 100 µl de probă de ser diluat în prealabil (de zece ori) în fiecare godet.

Pentru diluția directă în godet, pipetați 90 µl de diluant de protă și 10 µl de probă, în godet și amestecați bine.

Probile pot fi testate individual sau în duplicat.

- Stîripii trebuie plasati întotdeauna pe rama plăcii astfel încât armele dispozitive spațiatorul și cititorul să poată fi utilizate.

- Acoperiți godeurile cu film adeziv tăiat conform numărului de godeuri utilizate.

- Agitați manual placă prin scuturare usoară sau utilizând un agitator de placă.

3. Incubarea plăcii

Incubați pînă la peste noapte (14-18 ore) la $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

SPĂLARE:

Soluție tampon de spălare: diluați soluția concentrată de spălare (W) 1:10 în apă distilată sau demineralizată.

Scoateți cu grijă filmul adeziv și spălați de 4 ori.

II – ADĂUGAREA CONJUGATULUI

1. Prepararea conjugatului:

Pregătiți soluția de conjugat prin diluarea conjugatului concentrat (CJ) la 1:100 în diluant de conjugat (DC). (2 ml sunt necesari pentru un strip, adică 20 µl de CJ diluat la 1.98 ml de DC).

2. Distribuirea conjugatului:

Adăugați 100 µl conjugat diluat în toate godeurile și acoperiți-le cu o nouă bucată de film adeziv.

3. Incubarea conjugatului:

Incubați fie timp de 1 oră ± 5 min la $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, fie 30 min ± 5 min la $+37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

SPĂLARE:

Scoateți cu grijă filmul adeziv și spălați de 4 ori.

III - REVELAREA

1. Adăugarea substratului:

Adăugați 100 µl de substrat tamponat cu peroxidază (SP) în fiecare godet. Nu acoperiți cu film adeziv în această etapă. Amestecați manual placă prin agitare usoară sau utilizând un agitator de placă pentru a asigura o corectă omogenizare.

2. Incubarea substratului:

30 min. ± 5 min. la temperatura din laborator ($+23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), protejat de lumina.

3. Adăugarea soluției de stopare:

Adăugați 50 µl soluție de stopare (S) în fiecare godet.

Agitați manual placă prin scuturare usoară sau utilizând un agitator de placă. Asigurați-vă ca nu apar bule în godeuri.

4. Măsurarea densității optice:

Măsurăți densitatea optică (DO) bicromatic la 450 și 630 nm sau monocromatic la 450 nm (în banda galbenă).

Este recomandată citirea bicromatică. Dacă va fi utilizat un cititor monocromatic, asigurați-vă de curățenia fundului fiecărui godet înainte de citire.

DO N

VIII. EXPRIMAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Sunt posibile două metode de calcul și interpretare a rezultatelor:

PRIMA METODĂ: CALCULAREA PROCENȚAJULUI DE COMPETIȚIE (% Frobă)

Pentru fiecare probă: $\overline{D}O_N - \overline{D}O_{probă}$
 $\% Probă = \frac{\overline{D}O_N - \overline{D}O_{probă}}{\overline{D}O_N - \overline{D}O_P} \times 100$

Fiecare probă de ser ce prezintă un procentaj de competiție (% Probă) $\geq 50\%$ este considerată ca fiind pozitivă.

Fiecare probă de ser ce prezintă un procentaj de competiție (% Probă) $< 30\%$ este considerată ca fiind negativă.

Fiecare pool de seruri ce prezintă un procentaj de competiție (% Probă) $\geq 30\%$ este considerată ca fiind pozitivă.

Fiecare pool de seruri ce prezintă un procentaj de competiție (% Probă) $< 30\%$ este considerată ca fiind negativă.

Zona Dubioasă: Orice probă de ser individual ce prezintă un procentaj de competiție situat în zona de la 30 până la 50% este considerată dubioasă și trebuie retestată. Dacă o probă la re-testare este tot dubioasă, în zonă gri, se recomandă re-testare pe o probă diferită de la aceeași animal.

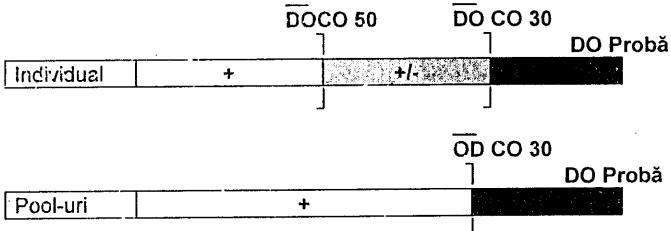
A DOUA METODĂ: ANALIZA DENSITĂȚILOR OPTICE

Calculați valoarea cut off a DO corespunzătoare la procentaj de competiție de 30 % și 50 % și comparați DO a fiecărei probe cu valoarea DO a cut off CO 30 și DO CO 50.

$$DO\ CO\ 30 = 0.70 \overline{D}O_N + 0.30 \overline{D}O_P$$

$$DO\ CO\ 50 = 0.50 \overline{D}O_N + 0.50 \overline{D}O_P$$

Interpretarea rezultatelor:



Dacă aveți întrebări, vă rugăm să ne contactați:

SYNBiotics EUROPE – Gerland Plaza –

23 rue Pierre Gilles de Gennes, 69007 LYON – France,

Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10

www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

NUMAI PENTRU UZ VETERINAR/
NUMAI PENTRU UTILIZARE IN VITRO

Fabricant: DELPHARM BIOTECH,
2 rue Alexander Fleming,
69366, LYON Cedex 07
France



VII. VALIDAREA TESTULUI

Rezultatul fiecărui test efectuat sunt valide dacă:

DO medie a martorului de control negativ (N) > 0.500 și procentul de competiție a martorului de control pozitiv (P) este $> 80\%$.

Acst procentaj poate fi calculat astfel:

$\% Probă = \frac{\overline{D}O_N - \overline{D}O_{probă}}{\overline{D}O_N - \overline{D}O_P} \times 100$

Referință : SBLV1.NA versiunea n°14 – 11/03/2013

Capitoiele modificate de la ultima versiunea sunt cu caracter italic. Versiunea n°13 → n°14: Schimbarea adresei Synbiotics Europe.

Adăugarea numelui și adresei producătorului.



A se depozita la +2°C/+8°C. A nu se congele.

Pentru diagnostic in-vitro. Pentru uz veterinar.

Serelisa® BLV Ab Mono Blocking (ASBLV1)

Kit pentru detecția anticorpilor anti-gp51ai virusului leucozei bovine
(BLV) în probele de ser

384 godeuri cu o singură reacție

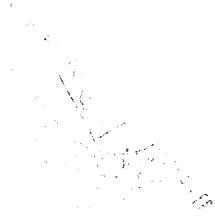
Microplacă cu 6 stripuri de 16 godeuri sensibilizate cu proteina gp51
a Virusului Leucozei Bovine

4

| | | |
|----|-------------------------------------|-----------|
| W | Soluție de spălare concentrație 10x | 1X200 ml |
| DP | Diluant pentru probe | 1X 100 ml |
| N | Martor de control negativ | 1X 5 ml |
| P | Martor de control pozitiv | 1X 5 ml |
| DC | Diluant pentru conjugat | 1X 50 ml |
| C | Conjugat concentrat | 1X 5 ml |
| SP | Substrat tamponat cu peroxidază | 1X 50 ml |
| S | Soluție de stopare | 1X 25 ml |
| | Filme adezive | 12 |

SYNBIOTICS EUROPE 2, rue A.Fleming 69007 LYON –France





Soluție de spălare concentrată X 10

Diag. in-vitro **W** 200 ml

A se depozita la +2°C/+8°C.

Lot:/
Exp/



SERELISA® BLV

Ab Mono Blocking

Zul.-Nr.BGVV-B223

1microplacă cu 6 strip-uri de 16 godeuri

A se depozita la +2°C/+8°C.

Lot:/
Exp/

Diag. in-vitro

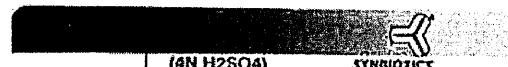


Substrat tamponat de peroxidază

Zul.Nr.K 028

Diagn. in-vitro **SP** 50 ml

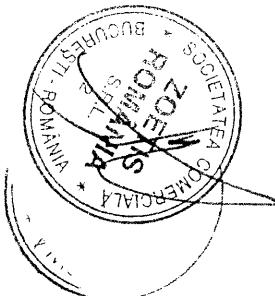
A se depozita la +2°C/+8°C.



Soluție de stopare

Zul.Nr.K 021

| | | | |
|-----|-----------------|----------|-----------------------------|
| R35 | Diagn. in-vitro | S | 25ml |
| S26 | | | |
| S30 | | | A se depozita la +2°C/+8°C. |
| S45 | | | |





Diluant pentru probe

Diagn. in-vitro

DP

Zul.Nr.K024

100ml



Diluant pentru conjugat

Diagn. in-vitro

DC

Zul.Nr.K022
50 ml

A se depozita la +2°C/+8°C.

A se depozita la +2°C/+8°C.



(-) Martor de control
Diagn. in-vitro **N** 5 ml
Exp/
Lot /

A se depozita la +2°C/+8°C.

Conjugat
Diagn. in-vitro **CJ** 5 ml
Exp/
Lot /

A se depozita la +2°C/+8°C.

(+) Martor de control
Diagn. in-vitro **P** 5 ml
Exp/
Lot /

A se depozita la +2°C/+8°C.

