

**KIT DETECTIE ANTICORPI SPECIFICI
AI PROTEINEI VP7 A VIRUSULUI BLUETONGUE
PRIN METODA ELISA DE COMPETITIE IN SERURI SI PLASMA
IDEXX Bluetongue Competition**

Versiune: 06-00450-11

Nume si destinatie

IDEXX Bluetongue Competition este un test IDEXX imunoenzimatic pentru detectia de anticorpi anti proteina VP7 a virusului Bluetongue (BTV) in probe individuale de ser sau plasma de origine bovina, caprina si ovina.

Informatii generale

Bluetongue este o boala virala care afecteaza oile, caprele, bovinele si rumegatoarele salbatice. Boala este transmisa de o insecta din genul *Culicoides* iar semnele clinice pot fi inflamatii intense, cu febra crescuta, congestia fetei si a limbii, edeme, ulceratii si hemoragii ale mucoaselor. Boala este cauzata de virusul limbii albastre (BTV), un Orbivirus cu ARN segmentat din familia *Reoviridae*. Sunt cunoscute 24 de serotipuri : printre care proteinele virale ale BTV, cele cu fractiune VP7 ce este comuna tuturor celor 24 de serotipuri, fiind specifica si imunogena pentru BTV.

Descriere si Principii

Microplacile sunt captusite cu proteina recombinanta VP7. Probele ce urmeaza a fi testate se dilueaza si se incubeaza in godeuri captusite. Dupa incubarea probelor in godeurile captusite, anticorpii specifici proteinei VP7 formeaza un complex imun antigen-anticorp cu proteina VP7. In prezenta complexului imun al anticorpilor VP7, conjugatul adaugat este blocat pentru a se lega cu epitopii corespondenti din microplaca. In schimb, in absenta anticorpilor VP7 in probele testate, conjugatul este liber sa se lege de epitopii corespondenti din microplaca. Conjugatul nelegat este eliminat prin spalare dupa care se adauga Substratul (TMB). In prezenta enzimei, substratul este oxidat si dezvolta un compus de culoare albastra ce devine galben dupa adaugarea solutiei de stopare. Culoarea dezvoltata este invers proportionala cu cantitatea de anticorpi anti-VP7 din probele testate.

Rezultatul este obtinut prin compararea Densitatii Optice a probei cu media Densitatilor Optice ale Controlului Negativ (vedeti in "Calculule" si " Interpretarea rezultatelor").

Reagenti

Toti reagentii trebuie depozitati la de 2-8°C

	REAGENTI	VOLUM	
1	Placi captusite cu proteina VP7-BTV	5	10
2	Control Pozitiv	1x1,0 ml	1x1,0 ml
3	Control Negativ	1x1,0 ml	2 x 1 ml
4	Conjugat concentrat (20x) (anti-VP7 HPRO)	1x4,0 ml	2 x 4,0 ml
5	Diluant N.2	1x120 ml	1x120 ml
A	Substrat TMB N.12	1x60 ml	1x120 ml
B	Solutie de stopare N.3	1x60 ml	1x120 ml
C	Solutie de spalare concentrata (20x)	100 ml	2 x 100 ml
	Alte componente : Pungi de plastic cu fermoar	1	1

Nota: vedeti tabelul de la sfarsitul prospectului pentru descrierea simbolurilor folosite in prospect si pe etichetele kitului.

Conservare

Toti reagentii trebuie depozitati la o temperatura de 2-8°C. Reagentii sunt stabili pana la data expirarii daca au fost depozitati corespunzator.



Materiale necesare nefurnizate in kit

- Micropipete de precizie si multicanal
- Varfuri de pipete de unica utilizare
- Cilindru gradat pentru solutia de spalare
- Cititor de microplaci cu 96 de godeuri (echipat cu filtru de 450 nm)
- Sistem de spalare a microplacilor (manual, semi-automat sau sistem automat)
- Apa distilata sau deionizata pentru prepararea reagentilor utilizati in test
- Capace pentru microplaci (folii adezive pentru microplaci, folii de aluminiu)
- Agitator tip vortex
- Sistem de agitare a microplacilor (shaker)

Precautii si avertizari pentru utilizatori

- Manipulati toate componentele luand in considerare riscul biologic potential.
- Purtati manusi de protectie/echipament de protectie/ ochelari de protectie/ masca de protectie.
- Pentru informatii suplimentare consultati "Material Safty Data Sheet".
- Pentru componentele cu risc biologic consultati prospectul trusei.

Buna Practica de Laborator

- Rezultate optime se obtin daca se urmareste cu strictete protocolul de testare. Pipetarea, cronometrarea timpilor de lucru si etapele de spalare trebuie respectate cu strictete pentru acuratetea testului. Pentru fiecare proba si control se va folosi un varf de pipeta nou.
- Substratul TMB nu se expune la lumina puternica sau agenti oxidativi. Pentru solutia TMB se vor folosi recipiente de sticla sau plastic curate.
- Toate reziduurile trebuie sa fie decontaminate inainte de eliminare. Eliminati recipientele cu reziduuri in conformitate cu reglementarile locale, regionale sau nationale.
- Se va evita contaminarea componentelor trusei. Nu se vor pune la loc in flacoanele originale reagentii neutilizati.
- Nu se utilizeaza reagenti expirati.

Prepararea reagentilor

Solutia de spalare

Solutia de spalare concentrata (20X) trebuie diluata 1:20 cu apa distilata/deionizata inainte de utilizare (de exemplu: 15 ml solutie de spalare concentrata (20X) in 285 ml apa distilata). Aceasta solutie va fi "Solutie de spalare".

Nota: Solutia de spalare concentrata (20X) se aduce la temperatura de 18-26°C si se agita pentru dizolvarea saruri precipitate. Solutia de spalare este stabila 3 zile daca este pastrata la 2-8°C.

Conjugatul

Conjugatul concentrat (20X) se dilueaza 1:20 cu Solutie de Spalare.

Nota: Solutia de conjugat diluat este stabila 8 ore la o temperatura de 18-26°C.

Procedura de lucru

Toti reagentii trebuie adusi la 18-26°C inainte de utilizare. Reagentii se omogenizeaza prin agitare usoara sau vortexare. Utilizati varfuri de pipete separate pentru fiecare proba.

1. Obtineti placile captusite si inregistrati pozitia fiecarei probe pe foaia de lucru. Daca se utilizeaza un numai partial de godeuri, restul godeurilor se vor pune in punga cu desicant si se vor pastra la 2-8°C.

2. Puneti 80 µl de Diluant N.2 in fiecare godeu.

3. Puneti 20 µl de Control Negativ (NC) NEDILUAT in duplicat.

4. Puneti 20 µl de Control Pozitiv NEDILUAT intr-un singur godeu.

5. Puneti 20 µl de Proba NEDILUATA in fiecare godeu.

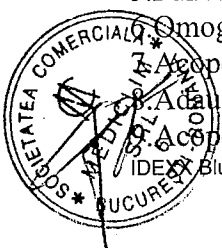
6. Omogenizati continutul godeurilor manual sau utilizand un agitator de microplaci.

7. Acoperiti placa de testare si incubati-o timp de 45 de minute (± 3 min) la 18-26°C

8. Adaugati 100 µl Conjugat DILUAT in fiecare godeu;

9. Acoperiti microplaca si incubati timp de 45 de minute (± 3 min) la 18-26°C

IDEEX Bluetongue Competiție



10. Eliminați conținutul lichid al godeurilor și spălați fiecare godeu cu aproximativ 300 μl Soluție de spălare de 3 ori. Aspirati conținutul lichid al godeurilor după fiecare spălare. După ultima îndepărtare a lichidului din placă, bateți placă pe un material absorbant pentru eliminarea lichidului rezidual. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent.

11. Adăugați 100 μl Substrat TMB Nr.12 în fiecare godeu;

12. Incubați 10 minute (± 3 min.) la 18-26°C ferit de lumina directă;

13. Adăugați 100 μl de Soluție de stopare N.3 în fiecare godeu.

14. Măsurati și înregistrați valorile absorbantelor ale Probelor și Controalelor la 450 nm.

Nota: Când utilizați sisteme automate, incubarea microplacilor în camera de incubare permite testarea pe placă neacoperită. Utilizarea sistemelor automate nu este compatibilă cu agitarea ușoară sau stergerea plăcilor. Plăcile pot fi ținute până la o oră în întuneric înainte de citire.

15. Calculul

Calcularea mediei Controlului Negativ (CN_x)

$$CN_x = \frac{CN1A_{450} + CN2A_{450}}{2}$$

Criterii de validare

$$0.700 \leq CN_x \leq 3.000$$

$$S/N\%CPA(450) < 20\%$$

Dacă rezultatele sunt nevalidate, se vor lua în considerare etapele de lucru și testul trebuie repetat după protocolul din prospect.

Calcul pentru probele de testat

$$S/N\% = 100x \frac{Pr obaA_{450}}{CN_x}$$

16. Interpretare

Negative
 $S/N \geq 80$

Dubioase
 $70 < S/N\% < 80$

Pozitive
 $S/N\% \leq 70$

IDEXX oferă sisteme de interpretare – instrumente și software pentru calculul rezultatelor și furnizează date.

Pentru asistență tehnică:

IDEXX SUA Tel: + 1 800 548 9997 sau + 1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contactați managerul sau distribuitorul IDEXX apropiat sau vizitați: idexx.com/contactlpd

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

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Toate drepturile rezervate.

