



INGEZIM BLV COMPAC 2.0

Prod Ref: 12.BLV.K3

Конкурентный (блокирующий) иммуноферментный анализ (ИФА) для специфического выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови крупного рогатого скота или молоке (индивидуальные или объединенные образцы).

Последняя версия: 21-04-15

Регистрационный номер в Испании: 0808-RD

INGEZIM BLV Компас 2.0
12.BLV.K3

СОСТАВ НАБОРА:

Реагент	2 планшета (2x8x12 лунок)		5 планшетов (5x8x12 лунок)		10 планшетов (10x8x12 лунок)	
	Кол- во	Объем	Кол- во	Объем	Кол- во	Объем
96-луночные планшеты для микротитрования, разделенные на 12 полосок по 8 лунок в каждой	2	-	5	-	10	-
Флаконы с положительной контрольной сывороткой	1	1,5 мл	2	1,5 мл	2	1,5 мл
Флаконы с отрицательной контрольной сывороткой	1	1,5 мл	2	1,5 мл	2	1,5 мл
Флаконы с конъюгатом (100 х концентрация)	1	700 мкл	1	700 мкл	2	700 мкл
Флаконы с раствором для промывания (25х концентрация)	1	125 мл	1	125 мл	2	125 мл
Флаконы с раствором для разведения (DE04-01) готовые к применению	1	125 мл	1	125 мл	2	125 мл
Флаконы с субстратом (ТМБ) готовые к применению	1	30 мл	1	60 мл	1	125 мл
Флаконы со стоп-раствором	1	60 мл	1	60 мл	1	125 мл

ДРУГИЕ МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ
для проведения исследования, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ НАБОРА:

Дистиллированная или деионизированная вода
Микропипетки от 5 до 200 мкл
Одноразовые наконечники для микропипеток
Устройство для промывания планшетов
Пробирки для исследования от 50 до 250 мл
Спектрофотометр (ELISA Reader) (с фильтром 450 нм)

I. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ:

Набор основан на конкурентном (блокирующем) иммуноферментном анализе (Blocking Elisa), основанном на использовании двух моноклональных антител против вирусного белка gp51. Данное исследование позволяет обнаружить антитела против вируса лейкоза КРС (BLV) в сыворотке крови или молоке (индивидуальных или объединенных образцах). Ниже приведено краткое описание принципа исследования:

Твердой фазой являются планшеты, покрытые белком gp51 вируса BLV, которые связаны с планшетом по средством двух специфических моноклональных антител к белку gp51 вируса BLV. После добавления образца в лунку, если он содержит специфические антитела против вируса, они будут связываться с антигеном, абсорбированным на лунках, если же образец не содержит специфических антител, связывания с фиксированным антигеном происходить не будет. При добавлении специфических моноклональных антител против вирусного антигена, покрывающего

планшет (конъюгированные с пероксидазой), они будут конкурировать с антителами сыворотки. Если образцы сыворотки содержат специфические антитела, они не позволят связываться меченым моноклональным антителам (Mab) с антигеном, тогда как, если образец не содержит специфических антител, моноклональные антитела (Mab) будут связываться с антигеном на планшете. После промывания планшета для удаления оставшегося нефиксированного материала, можно обнаружить присутствие или отсутствие меченых моноклональных антител (Mab), добавив субстрат (ТМВ), который в присутствии пероксидазы вызовет развитие колориметрической реакции. Колориметрическая реакция в лунках свидетельствует об отсутствии или наличии в исследуемых образцах антител против вируса лейкоза. При наличии антител раствор в лунках не окрашивается после добавления стоп-реагента. При отсутствии антител раствор в лунках окрашивается в желтый цвет после добавления стоп-реагента.

II. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

1. Внимательно прочитайте инструкцию по применению.
2. **ВАЖНО!** Довести все реагенты до комнатной температуры (20-25°C) перед использованием.
3. Не применять инструкции и не смешивать реагенты из наборов разного назначения.
4. Избегать загрязнения реагентов из набора.
5. Не использовать компоненты после истечения срока годности и не смешивать компоненты из разных партий.
6. Не допускается прием пищи, напитков или курение в местах работы с образцами или реагентами набора.
7. Не пилитировать ртом.
8. Использовать новый наконечник для каждого образца сыворотки.
9. Стоп-раствор является сильным кислотным раствором, который следует использовать с осторожностью. В случае контакта с кожей, тщательно промыть водой.
10. Контрольные положительная и отрицательные сыворотки должны использоваться каждый раз при постановке реакции.
11. Субстрат очень чувствителен к световому воздействию и загрязнениям. Соблюдайте аккуратность при обращении.

III. ХРАНЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

Все реагенты и планшеты должны храниться при температуре от + 2°C до + 8°C.

IV. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ЭТАПЕ ПРОМЫВАНИЯ:

Этапы промывания могут быть выполнены с использованием автоматического устройства для промывания планшетов или с применением многоканального дозирующего устройства с установленным объемом дозирования 300 мкл для каждой лунки.

После инкубации этапы промывания должны быть выполнены в соответствии со следующими инструкциями:

- ✓ Удалите содержимое планшета путем его резкого переворачивания, чтобы избежать возможного смешивания содержимого из одной лунки в другую.
- ✓ В каждую лунку внесите 300 мкл раствора для промывания.
- ✓ Осторожно встряхните планшет, избегая контаминации между лунками.
- ✓ Резко переверните планшет, чтобы удалить содержимое лунок.
- ✓ Повторите процесс столько раз, сколько указано в инструкции к набору.
- ✓ Избегайте высыхания лунок. Перед последним удалением содержимого планшета убедитесь, что следующий реагент готов к использованию.
- ✓ После последнего этапа промывания удалите содержимое переворачиванием и просушите планшет путем легкого постукивания по фильтровальной бумаге.

V. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ:

Образцы могут быть исследованы индивидуально (сыворотка или молоко) или объединено (до 10 образцов сыворотки). Когда используются образцы молока, рекомендуется перед исследованием проводить их обезжиривание.

VI. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ:

➤ **Раствор для промывания:**

Разведите одну часть концентрата моющего раствора из набора, 24 частями дистиллированной или деионизированной воды (40 мл раствора концентрата и 960 мл воды). Раствор остается стабильным при температуре от + 2°C до + 8°C.

➤ **Положительные и отрицательные контроли:**

Контроли должны быть подготовлены как исследуемые образцы, с объемом внесения: 50 мкл /лунка.

➤ **Подготовка конъюгата**

(готовить непосредственно перед использованием):

Развести необходимое количество конъюгата из набора в соотношении 1/100 с раствором для разведения:

- необходимое и достаточное количество конъюгата для всего планшета составляет 110 мкл конъюгата с 11 мл разбавителя;
- необходимое и достаточное количество конъюгата для 8 лунок одного стрипа составляет 10 мкл конъюгата с 1 мл разбавителя.

ВАЖНО! Конъюгат разводить в отдельном флаконе или пробирке. Полученный раствор перед использованием тщательно перемешать. Разведенный конъюгат перелить в ванночку для многоканального дозатора и оттуда переносить в лунки.

Готовить только необходимое количество конъюгата для данного исследования, так как остаток должен быть утилизирован.

VII. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Перед использованием все реагенты (кроме конъюгата) должны быть доведены до комнатной температуры.

2. Добавьте 50 мкл раствора для разведения в каждую лунку планшета. Затем добавьте по 50 мкл положительного контроля, отрицательного контроля и образцов в лунки планшета. Таким образом, вы будете исследовать образцы в разведении 1/2. Тщательно встряхните планшет для лучшей гомогенизации. Мы рекомендуем исследовать контрольные сыворотки в двух лунках (в повторениях). Инкубируйте планшет **1 час при 36°C±1°C**.

3. Промойте планшет 3 раза, следуя описанной выше процедуре.

4. Добавьте 100 мкл конъюгата (приготовленного согласно описанной выше инструкции) в каждую лунку. Инкубируйте планшет 30 минут при **36°C±1°C**.

5. Промойте планшет 4 раза, следуя описанной выше процедуре.

6. Добавьте 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Оставьте планшет в течение **10 минут при комнатной температуре**, в темном месте.

7. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку в том же порядке, в котором был добавлен субстрат.

8. Проведите измерение оптической плотности (ОП) каждой лунки с помощью спектрофотометра при 450 нм в течение 5 минут после добавления стоп-раствора.

VIII. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Измерение оптической плотности (ОП) проводят на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИЗА

Тест считается действительным, если значение ОП ОК более чем в 5 раз превышает значение ОП ПК:

$$\frac{\text{ОП ОК}}{\text{ОП ПК}} > 5$$

ОП ОК > 1, где

ОК – отрицательный контроль,
ПК – положительный контроль

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Расчет порогового значения Cut off:

$$\text{Отрицательный Cut off} = \text{ОП ОК} - [(\text{ОП ОК} - \text{ОП ПК}) \times 0.4]$$

$$\text{Положительный Cut off} = \text{ОП ОК} - [(\text{ОП ОК} - \text{ОП ПК}) \times 0.5]$$

2. Интерпретация результатов:

Вычислить среднеарифметическое значение ОП для контролей и образцов, если тестирование проводилось в дубликатах.

- Все образцы с ОП, превышающим или равным отрицательному пороговому значению, должны учитываться как **отрицательные**.
- Все образцы со значениями ОП, меньшими или равными положительному пороговому значению, будут учитываться как **положительные**.
- Образцы со значениями ОП между обеими пороговыми значениями должны учитываться как **сомнительные**. Для данных образцов новый анализ рекомендуется проводить через 3 недели.

ПРИМЕР:

Значения ОП:

- ОП ПК 0.154
- ОП ОК 1.750
- Образец 1 0.170
- Образец 2 1.684

1. Валидация анализа:

$$\frac{\text{ОК/ПК}}{\text{ОК}} = \frac{1.750}{1.750} = 1 > 5$$

2. Расчет порогового значения:

$$\text{Отрицательный Cut off} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.4] = 1.111$$

$$\text{Положительный Cut off} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.5] = 0.952$$

3. Интерпретация результатов:

Образец 1 » Положительный к BLV
Образец 2 » Отрицательный к BLV

Desarrollado y fabricado en España por:

Разработано и произведено в Испании:

INMUNOLOGIA Y GENETICA
APLICADA, S.A.
C/ Hnos. García Noblejas, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



IT-73840



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2