



INGEZIM BLV COMPAC 2.0

Prod Ref: 12.BLV.K3

Ultima reviziune: 21-04-15
Nº de înregistrare în Spania: 0808-RD



COMPONENȚA KITULUI

Reagenți	2 plăci (2x8x12 godeuri)		5 plăci (5x8x12 godeuri)		10 plăci (10x8x12 godeuri)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placi de microtitrare cu 96 godeuri, captușite. Divizate în 12 stripuri a câte opt godeuri.	2	-	5	-	10	-
Flacoane cu Ser Control Pozitiv	1	1,5 ml	2	1,5 ml	2	1,5 ml
Flacoane cu Ser Control Negativ	1	1,5 ml	2	1,5 ml	2	1,5 ml
Flacoane cu conjugat peroxidază (100x concentrat)	1	700 µl	1	700 µl	2	700 µl
Sticle cu soluție de spălare (25X concentrate)	1	125 ml	1	125ml	2	125 ml
Sticle cu Diluent (DE04-01) gata de utilizare	1	125 ml	1	125 ml	2	125 ml
Sticle cu Substrat (TMB) gata de utilizare	1	30 ml	1	60 ml	1	125 ml
Sticle cu Soluția de Stopare	1	60 ml	1	60 ml	1	125 ml

ALTE MATERIALE SI REAGENTI NECESARI CE NU SUNT FURNIZATI IN KIT
Apa distilata sau deionizata
Micropipeta cu volum variabil 5-200 µl
Vârfuri de pipeta de unica folosinta
Aparat pentru spălarea placilor
Tuburi de testatre 50 – 250 ml
Cititor ELISA (cu filtru 450 nm)

I. BAZA TEHNICA

Acest kit se bazează pe un test enzimatic de blocare (Elisa de blocare) bazat pe utilizarea a doi anticorpi monoclonali împotriva gp51 virală. Acest test permite detectarea anticorpilor împotriva BLV în serul bovin sau în lapte (individual sau grupat). Facem o scurtă descriere a tehnicii mai jos:

Faza solidă este reprezentată de plăci acoperite cu BLV gp51, legate de placă prin doi anticorpi monoclonali specifici împotriva proteinei virusului gp51. După adăugarea probei în godeu, dacă aceasta conține anticorpi specifici împotriva virusului, aceștia se vor lega de antigenul absorbit pe placă, în timp ce dacă proba nu conține anticorpi specifici, nu se vor lega de antigen.

Dacă adăugăm un anticorp monoclonal specific împotriva antigenului viral acoperit pe placă (conjugat cu peroxidază), acesta va concura cu anticorpii serului. Dacă probele de ser conțin anticorpi specifici, aceștia nu vor permite legarea Mab-ului marcat de antigen, în timp ce dacă nu conține anticorpi specifici, Mab se va lega de antigenul de pe placă. După spălarea plăcii pentru a elimina tot materialul ne fixat, putem detecta prezența sau absența Mab etichetat adăugând substratul (TMB) care în prezența peroxidazei va dezvolta o reacție colorimetrică.

II. PRECAUȚII ȘI AVERTIZĂRI PENTRU UTILIZATORI:

1. Citiți atent instrucțiunea de lucru.
2. Aduceți reagenții la temperatură camerei (20°-25°C) înainte de lucru.
3. Nu amestecați instrucțiuni sau reactivi din diferite kituri.
4. Evitați orice contaminare a reactivilor kitului.
5. Nu utilizați componente după datele de expirare și nu amestecați componente din loturi diferite.
6. Nu ar trebui să se mănânce, să se bea sau să se fumeze acolo unde se manipulează speciile sau reactivii trusa.
7. Nu pipetați pe gura.
8. Folosiți un varf nou pentru fiecare probă de ser.
9. Soluția de stopare este o soluție acidă puternică care trebuie utilizată cu precauție. În caz de contact accidental cu pielea, spălați ușor cu apă.
10. Pentru fiecare utilizare a kitului, serul de control pozitiv și negativ trebuie testat într-un mod sistematic.
11. Substratul trebuie să fie manipulat cu grijă, este foarte sensibil la lumină și contaminare.

III. DEPOZITAREA COMPONENTELOR KITULUI

Toți reagenții și plăcile trebuie păstrate la +2°C +8°C.

IV. INFORMAȚII DESPRE ETAPELE DE SPĂLARE

Etapile de spălare se pot face folosind o mașină de spălat automată sau un dispozitiv de pipetare multicanal adecvat pentru distribuirea a 300 μl pe fiecare godeu.

După perioadele de incubație, etapele de spălare trebuie făcute urmând instrucțiunile următoare:

- Aruncați conținutul godeurilor printr-o rășucire bruscă a plăcii pentru a evita posibilul amestec al conținutului dintr-un godeu în altul.
- Distribuți un volum de 300 μl de soluție de spălare pe fiecare godeu.

- Agitați delicat placa, evitând contaminarea dintre godeuri.
- Întoarceți plăcuța brusc pentru a goli godeurile.
- Repetați procesul de câte ori este indicat în instrucțiunile kitului.
- Înainte de a goli conținutul ultimei etape de spălare, verificați dacă următorul reactiv care trebuie adăugat pe placă este gata de utilizare. Nu mențineți placa uscată mai mult timp decât este strict necesar.
- După ultima etapă de spălare, răsturnați placa rotită peste o hârtie de filtru absorbantă și loviți-o ușor.



V. PREPARAREA REAGENȚILOR

- **Soluția de spălare:**

Diluati o parte din soluția de spălare concentrată furnizată în kit cu 24 părți de apă distilată sau deionizată (ex. 40 ml soluție concentrată și 960 ml apă). Odată gata această soluție, rămâne stabilă între + 2 ° C și + 8 ° C timp de maxim 3 luni, atâta timp cât vor fi menținute condiții adecvate.

- **Serurile de control Pozitiv și Negativ:**

Serurile de control trebuie testate ca probele, adaugand 50 µl/godeu.

- **Prepararea conjugatului (se va face imediat inaintea utilizării):**

Diluati cantitatea necesară de conjugat

livrată cu Kit 1/100 cu diluant:

⇒ Cantitatea necesară și suficientă de conjugat pentru o placă completă este de 110µl de conjugat în 11 ml de diluant.

⇒ Cantitatea necesară și suficientă de conjugat pentru o bandă de opt godeuri este de 10 µl conjugat în 1 ml de diluant.

Ajitați bine soluția înainte de utilizare.

Preparați doar cantitatea necesară pentru fiecare folosire, deoarece volumul rămas trebuie aruncat

VI. PREPARAREA PROBELOR:

- **Ser sangvin:**

Probele pot fi testate separate sau în amestec /pool (până la 10 probe în amestec).

- **Lapte:**

Probele se testează doar individual. Se recomandă degresarea laptelui înaintea testării.

VII. PROCEDURA DE LUCRU

1. Toți reagenții (cu excepția conjugatului) trebuie aduși la temperatura camerei înainte de utilizare.
2. Adăugați 50 µl de diluant DE04-01 la fiecare godeu al plăcii utilizate. Adăugați 50 µl de control pozitiv, control negativ și probe la godeurile plăcii. În acest fel, testați probele la o diluție 1/2. Agitați placa cu grijă pentru o mai bună omogenizare a diluției. Vă recomandăm să rulați serurile de control în duplicat, folosind 2 godeuri pentru fiecare. **Incubați placa 1 oră la +37°C.**
3. Spălați de 3 ori urmărind procedura recomandată.
4. Adăugați 100 µl de conjugat (preparat după instrucțiunile de mai sus) în fiecare godeu. **Incubați placa 30 minute la +37°C.**
5. Spălați de 4 ori urmărind procedura recomandată.
6. Adăugați 100 µl soluție substrat în fiecare godeu. Plasați placa într-un loc întunecat pentru **10 min la temperatura camerei.**
7. Adăugați 100 µl de soluție stop solution în fiecare godeu urmărind ordinea în care a fost adăugat substratul.
8. Citiți Densitatea Optică (DO) a fiecărui godeu la spectrofotometru de **450 nm** în 5 minute după adăugarea soluției de stopare.

VIII. CITIREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Citirea trebuie făcută la un spectrofotometru cu unda de **450 nm**.

* Dacă valoarea DO serului de Control Negativ este de 5 ori mai mare decât valoarea DO

Serului Control Pozitiv:

A. Validarea Testului:

Testul este considerat valid:



$$\frac{\text{DO (Ser Control Negativ)}}{\text{DO (Ser Control Pozitiv)}} > 5$$

- * Valoarea DO Ser Control Negativ trebuie sa fie **mai mare decât 1.**

B. Interpretarea rezultatelor:

1. *Calcularea valorii Cut:*

$$\sum \text{Negativ Cut Off} = \text{NC} - [(\text{NC} - \text{PC}) \times 0.4]$$

$$\sum \text{Pozitiv Cut Off} = \text{NC} - [(\text{NC} - \text{PC}) \times 0.5]$$

Unde: NC = Media valorilor DO Ser Control Negativ.

PC = Media valorilor DO Ser Control Pozitiv.

2. *Interpretarea rezultatelor:*

Dacă doriți lucrarea probelor în duplicat, valorile DO vor fi calculate pentru fiecare probă ca media aritmetică a ambelor valori.

⇒ Toate probele de ser cu DO mai mare sau egală cu valoarea Cut Off Negativ, vor fi considerate Negative.

⇒ Toate probele de ser cu DO mai mare sau egală cu valoarea Cut Off Pozitiv, vor fi considerate Pozitive.

Pentru probele de ser cu DO cuprinse între cele două valori de Cut Off vor fi considerate dubioase (incerte). Pentru acestea se recomandă efectuarea unui nou test cu probe prelevate după trei săptămâni.

Exemplu:

Media valorilor DO

* Control Pozitiv (PC)	0.154
* Control Negativ (NC)	1.750
* Proba 1	0.170
* Proba 2	1.684

1. *Validarea Testului:*

$$\text{NC/PC} = 11.3 > 5$$

$$\text{NC} = 1.750 > 1$$

2. *Calcularea valorii de Cut Off:*

$$\text{CUT OFF (-)} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.4] = 1.111$$

$$\text{CUT OFF (+)} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.5] = 0.952$$

3. *Interpretarea rezultatelor:*

Proba 1 » Pozitivă pentru anticorpi BLV

Proba 2 » Negativă pentru anticorpi BLV

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
Av.de la Institución Libre de Enseñanza, 39
8ª planta
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

Distributed in

by:

