

INSTRUCTIUNE UTILIZARE

INGEZIM BLV COMPAC 2.0

I. Fundamentul tehnic

Acest kit reprezintă un test imunoenzimatic de blocare (ELISA blocking) bazat pe utilizarea a doi anticorpi monoclonali împotriva gp51 virală. Acest test permite detectarea anticorpilor împotriva LEB în ser sau lapte bovin (individual sau pool-uri). Facem o scurtă descriere a tehnicii de mai jos:

Faza solidă sunt plăci acoperite cu LEB gp51, legate de placă prin doi anticorpi monoclonali specifici împotriva proteinei virusului gp51. După adăugarea probei în godeu, dacă 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 anticorpul 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-ul se va lega de antigenul de pe placă. După spălarea plăcii pentru a elimina tot materialul ne fixat, putem detecta prezența sau absența Mab-ului marcat prin adăugarea substratului (TMB) care, în prezența peroxidazei, va dezvolta o reacție colorimetrică.

II. PRECAUȚII ȘI AVERTISMENTE PENTRU UTILIZATORI:

1. Citiți cu atenție instrucțiunile de utilizare.
2. Aduceți toți reactivii la temperatura camerei (20 ° -25 ° C) înainte de utilizare.
3. Nu amestecați instrucțiuni sau reactivi din diferite truse.
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 kitului.
7. Nu pipetați cu gura.
8. Folosiți un varf nou pentru fiecare probă de ser.
9. Soluția stop este o soluție acidă puternică care trebuie să fie utilizată cu precauție. În caz de accident în contact cu pielea, se spală ușor cu apă.
10. Pentru fiecare utilizare a trusei, serul pozitiv și serul negativ trebuie testat sistematic.
11. Substratul trebuie manevrat cu grijă, este foarte sensibil la lumină și contaminare.

III. CONDITIILE DE DEPOZITARE

Toți reactivii și plăcile trebuie păstrate între + 2 ° C și + 8 ° C.

IV. INFORMAȚII DESPRE ETAPELE DE SPĂLARE

Etapele de spălare se pot face folosind o mașină de spălat automată sau un dispozitiv de pipetare multicanal adecvat pentru distribuirea a 300 μ l pe fiecare godeu. După perioada de incubare, etapele de spălare trebuie făcute urmând instrucțiunile următoare:

- Aruncați conținutul plăcii printr-o răsucire bruscă a plăcii pentru a evita amestecul posibil al conținutului dintr-un godeu în altul.
- Distribuiți un volum de 300 μ l de soluție de spălare pe fiecare godeu.
- Agitați delicat placa, evitând contaminarea dintre godeuri.
- Întoarceți placa brusc pentru a goli godeurile.
- Repetați procesul de câte ori este indicat în instrucțiunea 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 agitați placa răsucită peste o hârtie de filtru absorbantă.

V. PREGĂTIREA REACTIVILOR

- Soluția de spălare

Diluati o parte din soluția de spălare concentrată furnizată în kit cu 24 părți de apă distilată sau deionizată (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.

- Ser control pozitiv si negativ

Serurile trebuie tratate ca probe, adăugând 50 μ l / godeu.

- Pregătirea conjugatului (de pregătit imediat înainte de utilizare):

Diluati cantitatea necesară de conjugat furnizat în set 1/100 cu diluant:

- Cantitatea necesară și suficientă de conjugat pentru o placă completă este 110 μ l de conjugat în 11 ml de diluant.
- Cantitatea necesară și suficientă de conjugat pentru o bandă de opt godeuri este de 10 μ l conjugat în 1 ml de diluant.

Agitați foarte bine soluția înainte de utilizare.

Pregătiți doar cantitatea necesară pentru fiecare dată, deoarece volumul rămas trebuie înlaturat.

VI. PREGĂTIREA PROBELOR:

- Utilizarea serului:

Probele pot fi testate individual sau pool-uri (până la 10 probe de ser).

- Utilizarea laptelui:

Probele pot fi testate numai individual. Se recomandă degresarea probelor de lapte înainte de testare.

VII. PROCEDURA DE TESTARE

1. Toți reactivii (cu excepția conjugatului) trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei înainte de utilizare.
2. Adăugați 50 μ l de diluant DE04-01 la fiecare godeu al plăcii de utilizat. Adăugați 50 μ l de ser pozitiv, ser negativ și probe la godeurile plăcii. În acest fel, testați probele la o diluție $\frac{1}{2}$. Puneți placa cu grijă pentru o mai bună omogenizare a diluției. Vă recomandăm să rulați serurile de control în dublu exemplar, folosind 2 godeuri pentru fiecare. Pentru a evita efectul de bariera detectat atunci când se utilizează un fel de incubatoare, este recomandabil să nu folosiți fișierele externe pentru a adăuga comenzile). **Incubați placa 1 oră la 37 ° C.**
3. Se spală de 3 ori urmând procedura descrisă.
4. Adăugați 100 μ l de conjugat (preparat urmând instrucțiunile anterioare) în fiecare godeu. **Incubați placa timp de 30 de minute la + 37 ° C.**
5. Se spală de 4 ori urmând procedura descrisă.
6. Adăugați 100 μ l de soluție de substrat, la fiecare godeu. Păstrați placa timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc întunecat.
7. Adăugați 100 μ l de soluție stop la fiecare godeu urmând aceeași ordine în care s-a adăugat substratul.
8. Citiți DO-ul fiecărui godeu cu un spectrofotometru la 450 nm în 5 minute după fixarea soluției stop.

VIII. CITIREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Citirea trebuie făcută cu un spectrofotometru la 450 nm.

A. Validarea testului:

Testul ar putea fi considerat valid:

*Dacă valoarea DO a serului de control negativ este de peste 5 ori valoarea DO a serului de control pozitiv:

OD (Ser negativ de control)

_____ > 5

OD (ser de control pozitiv)

- DO-ul serului de control negativ trebuie să fie > 1.

B. Interpretarea rezultatelor:

1. Calcularea CUT Off

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

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

Unde: NC = Media valorilor DO ale serului de control negativ.

PC = Media valorilor DO ale serului de control pozitiv.

2. Interpretarea rezultatelor

Când rulați probe duplicate, valorile DO vor fi calculate pentru fiecare probă ca medie aritmetică a ambelor valori.

- Toate eșantioanele cu DO mai mare sau egal cu valoarea CUT OFF negativă trebuie considerate negative.
- Toate eșantioanele cu valori DO mai mici sau egale cu valorile pozitive CUT OFF vor fi considerate pozitive.

Probele cu valori DO între ambele limite trebuie considerate îndoielnice. Pentru aceste probe se recomandă o nouă analiză după 3 săptămâni.

EXAMPLE

Interpretari DO

* Control pozitiv (PC) 0.154

* Control negativ (NC) 1.750

* Proba 1 0.170

* Proba 2 1.684

Validarea testului

$$NC/PC = 11.3 > 5$$

$$NC = 1.750 > 1$$

Calcul CUT OFF

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

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

Interpretarea rezultatelor

Proba 1 » Pozitiv la anticorpul LEB

Proba 2 » Negativ la anticorpul LEB