

**Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV)
Antibody Test Kit**

**Kit de détection des Anticorps dirigés contre le
Virus de la Leucose Bovine Enzootique (BLV)**

**Kit para Detecção de Anticorpos contra o vírus
da Leucose Enzoótica Bovina (BLV)**

USO VETERINÁRIO

**Kit para la detección de Anticuerpos frente al
Virus de la Leucosis Bovina (BLV)**

**Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das
bovine Leukose-Virus**

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation ist entsprechend §17c TierSG zugelassen.

Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) Antibody Test Kit

For veterinary use only.

Name and Intended Use

IDEXX Leukosis Serum Screening is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection of Antibodies directed against Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) in individual serum and plasma samples from bovines, and pool of sera from bovines (maximum 10).

General Information

Enzootic Bovine Leukosis is an infectious lymphoproliferative disease in cattle which occurs throughout the world. The disease is caused by an exogenous delta-retrovirus, Enzootic Bovine Leukosis Virus which established a persistent infection in a sub-population of B lymphocytes by integration of proviral DNA at a number of sites on the cellular DNA. The majority of infected cattle remain healthy for life although approximately 30% develop a persistent lymphocytosis and a small portion (up to 10%) develops lymphoid tumors. The disease affects mainly dairy herds and spreads predominantly through horizontal transmission by exposure to blood or secretions containing infected lymphocytes. As no treatment or vaccine is available, the eradication programs are based on identification and elimination of infected animals which is realised mainly by detection of anti-viral Antibodies. The infected cattle produce specific Antibodies to the major viral proteins from an early stage of infection. Initially, the agar-gel immunodiffusion (AGID) test was widely used. However, the sensitivity of AGID test is limited and instances have been reported where infected animals failed to produce a detectable Antibody response. For this reason, ELISA method, which is simple, rapid, and sensitive method, is used for surveillance of herds.

Descriptions and Principles

Microplates are coated with BLV Antigen. Samples to be tested are diluted and incubated in the wells. Upon incubation of the test sample in the coated wells, BLV specific Antibodies form immune-complexes with BLV-Antigens. After washing away unbound material, an anti-bovine Antibody enzyme Conjugate is added which binds to any Antigen-Antibody immune-complex. Unbound Conjugate is washed away and enzyme Substrate (TMB) is added. In presence of the enzyme, the Substrate is oxidized and develops a blue compound becoming yellow after blocking. Subsequent color development is directly related to the amount of Antibody to BLV present in the test sample. The result is obtained by comparing the sample Optical Density with the Positive Control mean Optical Density.

Reagents**Volume**

		5	10
1	BLV Antigen Coated Plate		
2	Positive Control	1 x 1.0 mL	1 x 1.0 mL
3	Negative Control	1 x 1.0 mL	1 x 1.0 mL
4a	Conjugate Concentrate (100X)	1 x 1.5 mL	1 x 1.5 mL
4b	Dilution Buffer N.1	1 x 120 mL	1 x 120 mL
5	Dilution Buffer N.2	1 x 120 mL	2 x 120 mL
A	TMB Substrate N.13	1 x 60 mL	1 x 120 mL
B	Stop Solution N.3	1 x 60 mL	1 x 120 mL
C	Wash Concentrate (10X) N.2	2 x 100 mL	4 x 100 mL



Note: See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels of this kit.

Storage

Store the reagents at 2–8°C. Reagents are stable until expiration date, provided they have been stored properly.

Materials Required but Not Provided

- Precision pipettes or multiple-delivery pipetting devices suitable for delivering 10 to 1000 μ L
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinder for wash solution
- 96-well Microplate reader (equipped with 450 nm filter)
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test
- Vortex or equivalent
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)
- Centrifuge (2000 x g)
- Humid Chamber / Incubator capable of maintaining a temperature of 37°C (\pm 3°C)
- Microplate shaker
- Uncoated microplates or tubes for sample preparation

Precautions and Warnings

- Handle all biological material as potentially infectious.
- Wear protective gloves / protective clothing / eye or face protection when handling samples and reagents.
- Refer to the product Material Safety Data Sheet for additional information.
- See the end of this insert for reagent hazard and precaution warnings.

Laboratory Practices

- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting, timing, and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Use a separate pipette tip for each sample and control.
- Do not expose TMB solution to strong light or any oxidizing agents. Handle TMB solution with clean glass or plastic ware.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional, and national regulations.
- Care should be taken to prevent contamination of kit components. Do not pour unused reagents back into containers.
- Do not use kit past expiration date and do not intermix components from kits with different lot numbers.

Preparation of Reagents



Controls and Samples

The Dilution of the Samples and Controls depends on the selected incubation protocol and should be done in a pre-dilution plate or in tubes:

- Short protocol (1 hour (\pm 5 min.) at $+37^{\circ}\text{C}$ (\pm 3°C)): pre-dilute Controls and Samples 1:20 with Dilution Buffer N.2.
- Overnight protocol (16–24 hours at $2-8^{\circ}\text{C}$): pre-dilute Controls and Samples 1:50 with Dilution Buffer N.2.



Wash Solution

The Wash Concentrate (10X) N.2 must be diluted 1:10 with distilled/deionized water before use (e.g. 30 ml of Wash Concentrate (10X) N.2 in 270 ml of distilled water). This solution is hereafter called "Wash Solution".

Note: The Wash Concentrate (10X) N.2 should be brought to $18-26^{\circ}\text{C}$ and well mixed to ensure dissolution of any precipitated salts. The Wash Solution is stable for up to 3 days when stored at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Conjugate

The Conjugate Concentrate (100X) must be diluted 1:100 in the Dilution Buffer N.1.

Note: the diluted Conjugate solution is stable for up to 8 hours at $18-26^{\circ}\text{C}$.

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use. Mix reagents by gentle inverting or swirling.

1 Obtain coated microplates and record the position of each sample.



2 Distribute samples and controls:

Short protocol: 1 hour (± 5 min.) at +37°C (± 3 °C):

- Dispense 100 μL of DILUTED Negative Control into one appropriate well.
- Dispense 100 μL of DILUTED Positive Control into two appropriate wells.
- Dispense 100 μL of DILUTED samples into remaining wells.
- Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
- Cover the microplate and incubate for 1 hour (± 5 min.) at +37°C (± 3 °C).

Overnight protocol : 16–24 hours at 2–8°C:

- Dispense 100 μL of DILUTED Negative Control into one appropriate well.
 - Dispense 100 μL of DILUTED Positive Control into two appropriate wells.
 - Dispense 100 μL of DILUTED samples into remaining wells.
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate and incubate for 16–24 hours at 2–8°C.
-

3 Remove the solution and wash each well with approximately 300 μL of Wash Solution three times. Avoid plate drying between plate washings and prior to the addition of the next reagent. Tap each plate onto absorbent material after the final wash to remove any residual wash fluid.

4 Dispense 100 μL of DILUTED Conjugate into each well.

5 Cover the microplate and incubate for 30 minutes (± 3 min.) at +37°C (± 3 °C).

6 Repeat step 3.

7 Dispense 100 μL of TMB Substrate N.13 into each well.

8 Incubate 20 minutes (± 3 min.) at 18–26°C away from direct light.

9 Dispense 100 μL of Stop Solution N.3 into each well.

10 Measure and record Optical Densities values of samples and Controls at 450 nm.

11 Calculate results.

Note: When using robotics, incubation of microplates in an incubation chamber allows working without plate covers. Use of robots is also not compatible with gentle microplate tapping or wiping. Plates can be held up to 1 hour in the dark prior to reading.

12 Calculations:

Controls

$$PC\bar{x} = \frac{PC1 (A450) + PC2 (A450)}{2}$$

Validity criteria

$$PC\bar{x} \geq 0.350$$

$$PC\bar{x} : NC(A450) \geq 3.00$$

For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the package insert.

Samples

$$S/P \% = \frac{\text{Sample (A450)} - NC (A450)}{PC\bar{x} - NC(A450)}$$



13 Interpretation:

Individual Sera and Plasma samples

Negative

$$S/P \% \leq 60$$

Positive

$$S/P \% > 60$$

Pools of Sera

Negative

$$S/P \% \leq 40$$

Positive

$$S/P \% > 40$$

Note: IDEXX has instrument and software systems available which calculate results and provide data summaries.

For technical assistance:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website: idexx.com/contactlpd

IDEXX and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries

© 2014 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Kit de détection des Anticorps dirigés contre le Virus de la Leucose Bovine Enzootique (BLV)

Réservé à l'usage vétérinaire.

Définition et application

IDEXX Leukosis Serum Screening est un test immunoenzymatique pour la détection des Anticorps dirigés contre le Virus de la Leucose Bovine Enzootique (BLV) à partir d'échantillons individuels de sérum et de plasma bovins, ou de mélanges de sérums bovins (maximum 10).

Informations Générales

La Leucose Bovine Enzootique est une maladie infectieuse lymphoproliférative des bovins, connue partout dans le monde. Cette maladie est produite par un delta-rétrovirus exogène, Virus de la Leucose Bovine Enzootique, qui provoque une infection persistante d'une sous-population des lymphocytes B, par l'intégration de l'ADN proviral dans certains sites de l'ADN cellulaire. La majorité des bovins infectés ne présentent pas de symptôme, mais 30% développent une lymphocytose persistante, et un nombre faible d'animaux (moins de 10%) peuvent développer des tumeurs lymphoïdes. La maladie affecte particulièrement les exploitations de bovins laitiers, et la transmission se fait surtout horizontalement par le sang ou les sécrétions contenant des lymphocytes infectés. Aucun traitement, ni vaccin, n'étant disponible, les programmes d'éradication du BLV reposent sur l'identification et l'élimination des animaux infectés qui se fait par la détection des Anticorps spécifiques. Les animaux infectés développent précocement des Anticorps spécifiques contre les protéines virales majeures. Initialement le test d'immunodiffusion en gélose (IDG) a été largement utilisé. La sensibilité de ce test est limitée et plusieurs communications ont rapporté la présence d'animaux infectés avec un niveau d'Anticorps non détectable par cette méthode. Pour cette raison, la méthode ELISA facile à mettre en oeuvre, plus rapide et surtout plus sensible est utilisée pour la surveillance des troupeaux.

Description et principe

Les microplaques sont sensibilisées avec un Antigène BLV. Les échantillons à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits de la microplaque sensibilisée. En présence d'Anticorps spécifiques du BLV dans l'échantillon à tester, il se forme des immun-complexes Antigène –Anticorps. Après lavage, un Conjugué immunoglobuline anti-bovin couplé à une enzyme est mis à incuber. Ce Conjugué se fixe sur les immun-complexes Antigène–Anticorps. Après lavage, le Substrat de l'enzyme (TMB) est distribué dans les puits. En présence d'enzyme, le Substrat est oxydé et développe une coloration bleue virant au jaune après distribution de la Solution d'arrêt. L'intensité de la coloration qui en résulte est directement proportionnelle à la quantité d'Anticorps anti-BLV présente dans l'échantillon à tester. Le résultat est établi en comparant la Densité Optique de l'échantillon à la Densité Optique moyenne du Contrôle Positif.

Réactifs

Volume

		5	10
1	Plaque sensibilisée avec des antigènes du BLV		
2	Contrôle positif	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
3	Contrôle négatif	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
4a	Conjugué concentré (100X)	1 x 1,5 ml	1 x 1,5 ml
4b	Tampon de dilution N°1	1 x 120 ml	1 x 120 ml
5	Tampon de dilution N°2	1 x 120 ml	2 x 120 ml
A	Substrat TMB N°13	1 x 60 ml	1 x 120 ml
B	Solution d'arrêt N°3	1 x 60 ml	1 x 120 ml
C	Solution de lavage concentrée (10X) N.2	2 x 100 ml	4 x 100 ml



Remarque: voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles utilisés dans ce mode d'emploi et sur les étiquettes de la trousse.

Conservation

Conserver les réactifs à 2–8°C. Les réactifs sont stables jusqu'à leur date de péremption à condition d'être conservés correctement.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision ou pipettes multicanaux
- Embouts de pipette à usage unique
- Éprouvette graduée pour la préparation de la solution de lavage
- Lecteur de plaque 96 puits (équipé d'un filtre à 450 nm)
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation des réactifs
- Vortex ou équivalent
- Couvercles pour microplaques, aluminium ou adhésifs
- Centrifugeuse à 2000 x g
- Agitateur de microplaques
- Chambre humide / Incubateur de plaques à +37°C (±3°C)
- Plaques de dilution ou tubes pour la préparation des échantillons

Précautions d'emploi et mises en garde

- Manipuler tout matériel biologique comme étant potentiellement infectieux.
- Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux ou du visage lors de la manipulation des échantillons et des réactifs.
- Se reporter à la fiche de sécurité du produit pour plus d'informations.
- Voir à la fin du mode d'emploi pour les risques et mesures de prévention liés aux réactifs.

Pratiques de laboratoire

- Des résultats optimaux seront obtenus en se conformant de manière stricte au protocole fourni. La précision du test dépend des éléments suivants: pipetage, minutage et lavage minutieux au cours de cette procédure. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon et chaque contrôle.
- Ne pas exposer la solution de substrat TMB à la lumière directe du soleil ou à des agents oxydants. Veiller à la propreté de la verrerie et/ou du matériel de laboratoire en matière plastique utilisés lors de sa manipulation.
- Tous les déchets doivent être correctement décontaminés avant leur élimination. Éliminer les contenus selon les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.
- Éviter la contamination des composants du kit. Ne pas verser les réactifs non utilisés de nouveau dans les conteneurs.
- Ne pas utiliser les trousse après leur date de péremption et ne pas mélanger les composants avec ceux de trousse ayant un numéro de lot différent.

Préparation des réactifs



Contrôles et Echantillons

La dilution des Contrôles et des échantillons dépend du protocole d'incubation choisi et doit être réalisée dans une plaque ou un tube de pré-dilution:

- Protocole court (1 heure (\pm 5 min.) à $+37^{\circ}\text{C}$ (\pm 3°C)): pré-diluer les Contrôles et les échantillons au 1:20 dans le Tampon de dilution N.2.
- Protocole long (16–24 heures à $2-8^{\circ}\text{C}$): pré-diluer les Contrôles et les échantillons au 1:50 dans le Tampon de Dilution N°2.



Solution de lavage

Diluer la Solution de lavage concentrée (10X) N.2 au 1:10 dans de l'eau distillée/déionisée avant utilisation (ex.: 30 ml de Solution de Lavage concentrée (10X) dans 270 ml d'eau distillée). Cette solution est désignée par la suite "Solution de lavage".

Note: Remettre la Solution de lavage concentrée (10X) N.2 à $18-26^{\circ}\text{C}$ et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La Solution de lavage est stable pendant trois jours à $2-8^{\circ}\text{C}$.

Conjugué

Diluer le Conjugué concentré (100X) au 1:100 dans le Tampon de Dilution N°1.

Note: Le Conjugué dilué est stable pendant 8 heures à $18-26^{\circ}\text{C}$.

Mode opératoire

Porter tous les réactifs à 18–26°C avant utilisation et bien homogénéiser par agitation douce ou inversion.

- 1 Réserver le nombre de plaque(s) sensibilisée(s) nécessaire(s) à la manipulation et établir le plan de distribution d'échantillons sur la microplaque.
-



- 2 Distribuer les échantillons et les Contrôles:

Protocole court (1 heure (± 5 min.) à +37°C (± 3°C)):

- Distribuer 100 µl de Contrôle Négatif DILUE dans un puits approprié.
- Distribuer 100 µl de Contrôle Positif DILUE dans deux puits appropriés.
- Distribuer 100 µl de chaque échantillon DILUE à tester dans les puits disponibles adjacents.
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque et incuber 1 heure (± 5 min.) à +37°C (± 3°C).

Protocole Long (16–24 heures à 2–8°C):

- Distribuer 100 µl de Contrôle Négatif DILUE dans un puits approprié.
 - Distribuer 100 µl de Contrôle Positif DILUE dans deux puits appropriés.
 - Distribuer 100 µl de chaque échantillon DILUE à tester dans les puits disponibles adjacents.
 - Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
 - Couvrir la microplaque et incuber 16–24 heures à 2–8°C.
-

- 3 Éliminer le liquide contenu dans les puits de la microplaque et laver 3 fois chaque puits avec environ 300 µl de Solution de lavage. Éviter la dessiccation des puits de la microplaque entre les lavages et préalablement à la distribution du prochain réactif. Après le dernier lavage, vider le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la plaque sur du papier absorbant.
-

- 4 Distribuer 100 µl de Conjugué DILUÉ par puits.
-

- 5 Couvrir la microplaque et incuber 30 minutes (±3 min.) à +37°C (± 3°C).
-

- 6 Répéter l'étape n°3
-

- 7 Distribuer 100 µl de Substrat TMB N°13 par puits.
-

- 8 Incuber 20 minutes (±3 min.) à 18 -26°C à l'abri de la lumière.
-

- 9 Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt N°3 par puits.
-

- 10 Enregistrer les Densités Optiques à 450nm.

11 Calculer les résultats.

Note: Lors de l'utilisation de robots, l'incubation des microplaques en chambre d'incubation permet de s'affranchir de l'utilisation de couvercles. De même, les étapes de tapotement et d'essuyage des microplaques sont incompatibles avec ces derniers.

La lecture peut se faire jusqu'à 1 heure après distribution de la Solution d'arrêt N°3 à condition de conserver les microplaques à l'obscurité.

12 Calculs:

Contrôles

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 (A450) + CP2 (A450)}{2}$$

Critères de validité

$$CP\bar{x} \geq 0,350$$

$$CP\bar{x} : CN(A450) \geq 3,00$$

Si le test est invalide, la technique doit être suspectée et le test répété en suivant scrupuleusement le mode opératoire.

Échantillons

$$E/P \% = \frac{\text{Échantillon (A450)} - CN (A450)}{CP\bar{x} - CN(A450)}$$



13 Interprétation:

Sérums et plasmas individuels

Négatifs

$$E/P \% \leq 60$$

Positifs

$$E/P \% > 60$$

Mélanges de sérums

Négatifs

$$E/P \% \leq 40$$

Positifs

$$E/P \% > 40$$

Remarque: IDEXX fournit équipements et logiciels pour le calcul des résultats et la synthèse des données.

Pour l'assistance technique:

IDEXX É.-U. Tél.: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tél.: +800 727 43399

Contactez votre chef de secteur d'IDEXX ou votre distributeur ou visitez notre site web: idexx.com/contact

IDEXX et Test With Confidence sont des marques de commerce ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories, Inc. ou ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

© 2014 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

Kit para Detecção de Anticorpos contra o vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV)

Para uso exclusivamente veterinário.

Nome e Indicações

IDEXX Leukosis Serum Screening é um imunoenensaio enzimático da IDEXX para detecção de anticorpos direcionados contra o vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV) em amostras individuais de soro e de plasma e em pools de amostras de soro de bovinos (máximo 10).

Informações gerais

A leucose enzoótica bovina (BLV) é uma doença linfoproliferativa infecciosa do gado bovino que ocorre em todo o mundo. Esta doença é causada por um delta-retrovírus exógeno, o vírus da leucose enzoótica bovina, que estabeleceu uma infecção persistente em uma subpopulação de linfócitos B através da integração de DNA proviral a vários pontos do DNA da célula.

A maioria do gado bovino infectado permanece saudável durante toda a vida, apesar de aproximadamente 30% desenvolver uma linfocitose persistente e uma pequena parte (de até 10%) desenvolver tumores linfóides. Esta doença ataca principalmente rebanhos leiteiros e dissemina-se sobretudo por transmissão horizontal através da exposição a sangue ou a secreções contendo linfócitos infectados. Não há tratamento ou vacina disponível e, por esta razão, os programas de erradicação baseiam-se na identificação e na eliminação de animais infectados, a identificação sendo realizada principalmente através da detecção de anticorpos antivirais. O gado bovino infectado produz anticorpos específicos direcionados contra as principais proteínas virais desde um estágio precoce da infecção. Inicialmente o teste de imunodifusão em gel de ágar (AGID) foi amplamente utilizado. No entanto, a sensibilidade de testes AGID é limitada e houve casos em que animais infectados não produziram uma resposta de anticorpos detectáveis. Por esta razão, utiliza-se o método ELISA, que é um método simples, rápido e sensível, para a vigilância de rebanhos.

Descrição e Princípios

Placas são recobertas com o antígeno BLV. Durante a incubação da amostra de teste nas cavidades impregnadas, os anticorpos específicos do antígeno BLV formam um complexo imune antígeno-anticorpo. Após a remoção por lavagem do material não ligado, é adicionado um Conjugado anti-bovino IgG HRPO que se liga a qualquer complexo imune antígeno-anticorpo. O Conjugado não ligado é removido por lavagem e é adicionado um Substrato de enzima (TMB). Na presença da enzima, o Substrato é oxidado e desenvolve um composto azul que se transforma em amarelo após o bloqueio. O subsequente desenvolvimento da cor está diretamente relacionado à quantidade de anticorpos do BLV presente na amostra de teste. O resultado é obtido através da comparação da densidade ótica da amostra com a densidade ótica da média do Controle Positivo.

Reagentes**Volume**

		5	10
1	Placa Impregnada com Antígeno BLV		
2	Controle Positivo	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
3	Controle Negativo	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
4a	Conjugado Concentrado (100X)	1 x 1,5 ml	1 x 1,5 ml
4b	Tampão de Diluição No.1	1 x 120 ml	1 x 120 ml
5	Tampão de Diluição No.2	1 x 120 ml	2 x 120 ml
A	Substrato TMB No.13	1 x 60 ml	1 x 120 ml
B	Solução de Interrupção No.3	1 x 60 ml	1 x 120 ml
C	Concentrado de Lavagem (10X) No.2	2 x 100 ml	4 x 100 ml



Nota: Ver a tabela no final do inserte para uma descrição dos símbolos utilizados na inserte e nos rótulos deste kit.

Armazenagem

Conservar os reagentes a 2–8°C. Os reagentes são estáveis até a data de validade, desde que sejam devidamente conservados.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Micropipetas de precisão e micropipetas multicanal
- Ponteiras de pipeta descartáveis
- Proveta graduada para a solução de lavagem
- Leitor de placas para 96 cavidades (equipado com filtro 450 nm)
- Lavador de microplaca (sistema manual, semi-automático ou automático)
- Usar somente água destilada ou deionizada para o preparo dos reagentes usados no teste
- Vórtex ou equivalente
- Tampa para placas (tampa plástica, papel alumínio ou adesivo)
- Centrífuga (capacidade de 2000 x g)
- Agitador de placas
- Câmara Úmida / Incubadora capaz de manter uma temperatura de +37°C (± 3°C)
- Placas não impregnada ou tubos para a preparação de amostras

Precauções e Advertências

- Manipular todos os materiais biológicos como potencialmente infectantes.
- Usar luvas de protecção / vestuário / olhos ou o rosto de protecção ao manusear amostras e reagentes.
- Consultar o Ficha de Segurança produto para informações adicionais.
- Ver no final do protocolo para os perigos e medidas de prevenção relacionados com os reagentes.

Práticas laboratoriais

- Resultados ótimos serão obtidos seguindo-se rigorosamente o protocolo deste teste. Pipetagem cuidadosa, observação dos tempos de incubação e lavagens corretas durante todo o procedimento são necessários para manter a precisão e acurácia. Usar uma ponteira diferente para cada amostra e controle.
- Não expor a solução de TMB à luz forte ou a agentes oxidantes. Manusear a solução de TMB em recipientes limpos de vidro ou plástico.
- Todos os resíduos devem ser descontaminados adequadamente antes do descarte. Descartar os conteúdos de acordo com as normas locais, regionais e nacionais.
- Ter cuidado para evitar a contaminação dos componentes do kit. Não devolver a sobra do reagente ao frasco.
- Não utilizar kits com prazo de validade vencido e não misturar componentes de kits de lotes diferentes.

Preparo das reagentes



Controles

A diluição dos controles e amostras depende do protocolo de incubação e deverá ser feita num placa não impregnada ou tubo:

- Incubação curta (1 hora (\pm 5 min.) a $+37^{\circ}\text{C}$ (\pm 3°C)): pré-diluir Controles e amostras 1:20 com o Tampão de Diluição No.2.
- Incubação durante a noite (16–24 horas entre $2-8^{\circ}\text{C}$): pré-diluir Controles e amostras 1:50 com o Tampão de Diluição No.2.



Solução de Lavagem

O Concentrado de Lavagem (10X) N.2 deve ser diluído em uma proporção de 1:10 com água destilada / deionizada antes do uso (por. ex. 30 ml de Concentrado de Lavagem (10X) N.2 em 270 ml de água destilada). Esta solução é denominada a seguir de "Solução de Lavagem".

Nota: O Concentrado de Lavagem (10X) N.2 deve alcançar a $18-26^{\circ}\text{C}$ e estar bem misturado para garantir a dissolução de quaisquer sais precipitados.

A Solução de Lavagem é estável por até 3 dias se armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Conjugado

O Conjugado Concentrado (100X) deve ser diluído em uma proporção de 1:100 no Tampão de Diluição No.1.

Nota: A Solução do Conjugado diluído é estável por até 8 horas a $18-26^{\circ}\text{C}$.

Procedimento de Teste

Permitir que os reagentes atinjam 18–26°C, então mesclar gentilmente através de inversão ou movimentos circulares leves.

1 Obter as placas impregnadas e registrar a posição de cada uma das amostras em uma folha de trabalho.



2 Distribuir Controles e amostras:

Incubação curta (1 hora (\pm 5 min.) a +37°C (\pm 3°C)):

- Adicionar 100 μ l de Controle Negativo DILUÍDO em uma cavidade.
- Adicionar 100 μ l de Controle Positivo DILUÍDO em duas cavidades.
- Adicionar 100 μ l de cada amostra DILUÍDA na cavidade.
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a placa e incubar por 1 hora (\pm 5 min.) a +37°C (\pm 3°C).

Incubação durante a noite (16–24 horas a 2–8°C)

- Adicionar 100 μ l de Controle Negativo DILUÍDO em uma cavidade.
 - Adicionar 100 μ l de Controle Positivo DILUÍDO em duas cavidades.
 - Adicionar 100 μ l de cada amostra DILUÍDA na cavidade.
 - Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
 - Cobrir a placa e incubar por 16–24 horas a 2–8°C.
-

3 Remover o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar cada cavidade com aproximadamente 300 μ l de Solução de Lavagem por três vezes. Evitar que a placa seque entre as lavagens e antes da adição do próximo reagente. Após a lavagem final, remover o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente.

4 Adicionar 100 μ l do Conjugado DILUÍDO em cada cavidade.

5 Cobrir a placa e incubar por 30 minutos (\pm 3 min.) a +37°C (\pm 3°C).

6 Repetir o passo 3.

7 Adicionar 100 μ l do Substrato TMB No.13 em cada cavidade.

8 Incubar durante 20 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C longe da luz direta.

9 Adicionar 100 μ l da Solução de Interrupção No.3.

10 Medir e registrar os valores de densidade ótica das amostras e Controles a 450 nm.

11 Calcular os resultados.

Notas: Quando os robôs utilizando, a incubação da placa na incubadora não precisa usar capas. Tenha cuidado para não bater ou sacudir a placa quando se usa um robô.

As leituras podem ser feitas até uma hora após a distribuição da Solução Interrupção No.3, se as placas foram mantidas no escuro.

12 Cálculos:

Controles

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 (A450) + CP2 (A450)}{2}$$

Critérios de Validade

$$CP\bar{x} \geq 0,350$$

$$CP\bar{x} : CN(A450) \geq 3,00$$

Para testes inválidos, deve-se suspeitar da técnica, e o teste deve ser repetido após a revisão cuidadosa do protocolo do produto.

Amostras

$$A/P \% = \frac{\text{Amostra (A450)} - \text{CN (A450)}}{CP\bar{x} - \text{CN(A450)}}$$



13 Interpretação:

Amostras individuais de soro e de plasma

Negativas

$$A/P \% \leq 60$$

Positivas

$$A/P \% > 60$$

Pools de amostras de soro

Negativas

$$A/P \% \leq 40$$

Positivas

$$A/P \% > 40$$

Nota: IDEXX têm instrumentos e software disponíveis para o cálculo de resultados e a elaboração de resumo de dados.

Para assistência técnica:

IDEXX EUA Tel: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte o representante local ou distribuidor IDEXX ou visite: idexx.com/contactlptd

IDEXX e Test With Confidence são marcas ou marcas registradas de IDEXX Laboratories Inc. ou de suas filiais nos Estados Unidos e/ou em outros países.

© 2014 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus de la Leucosis Bovina (BLV)

Para uso veterinario exclusivo.

Nombre y uso propuesto

IDEXX Leukosis Serum Screening es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de anticuerpos frente al Virus de la Leucosis Bovina Enzootica (BLV) en muestras de suero y plasma individuales, y mezclas de hasta 10 sueros de bovino.

Información general

La Leucosis Bovina Enzootica es una enfermedad infecciosa linfoproliferativa en ganado bovino distribuida por todo el mundo. La enfermedad es causada por un delta-retrovirus exógeno, Virus de la Leucosis Bovina Enzootica que provoca una infección persistente en una subpoblación de linfocitos B mediante la integración de ADN proviral a un número de sitios del ADN celular. La mayoría del ganado infectado permanece sano de por vida, aproximadamente el 30% desarrolla una linfocitosis persistente, y una pequeña parte (hasta el 10%) desarrolla tumores linfáticos. La enfermedad afecta principalmente al ganado lechero y se disemina principalmente por transmisión horizontal por contacto con sangre o secreciones que contienen linfocitos infectados. No existe en la actualidad tratamiento ni vacuna, por lo que la erradicación de la enfermedad se basa en la identificación y eliminación de animales infectados, que se realiza principalmente por la detección de anticuerpos antivirales. Los animales infectados producen anticuerpos específicos frente a la principal proteína viral desde los primeros estados de la infección. El test de inmunodifusión en Agar (AGID) fue muy utilizado. Pero la sensibilidad del AGID es limitada, habiéndose notificado casos de falsos negativos en análisis realizados con esta técnica. Por este motivo, actualmente se realiza la vigilancia de los rebaños por el método ELISA que es más simple, rápido y sensible.

Descripción y principios

Las placas están tapizadas con antígeno de BLV. Las muestras a analizar se diluyen y se incuban en los pocillos. Cualquier anticuerpo presente en la muestra específico frente a BLV forma un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. Tras el lavado, se incuban en los pocillos un anticuerpo anti-bovino unido a un enzima. El Conjugado se une a los complejos antígeno-anticuerpo. Después de otro lavado, se añade a los pocillos el enzima Substrato (TMB). En presencia del enzima, el Substrato se oxida generando una coloración azul, que vira a amarilla al añadir la Solución de Frenado. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos anti-BLV presentes en la muestra. Los resultados se obtienen comparando la densidad óptica de la muestra con la densidad óptica media del Control Positivo.

Reactivos**Volumen**

		5	10
1	Placa tapizada con Antígeno BLV		
2	Control Positivo	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
3	Control Negativo	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
4a	Conjugado Concentrado (100X)	1 x 1,5 ml	1 x 1,5 ml
4b	Solución Tampón de Dilución n.º1	1 x 120 ml	1 x 120 ml
5	Solución Tampón de Dilución n.º2	1 x 120 ml	2 x 120 ml
A	Substrato TMB n.º13	1 x 60 ml	1 x 120 ml
B	Solución de Frenado n.º3	1 x 60 ml	1 x 120 ml
C	Solución de Lavado Concentrada (10X) n.º2	2 x 100 ml	4 x 100 ml



Nota: Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos utilizados en este protocolo y en las etiquetas del kit.

Almacenamiento

Almacenar los reactivos a 2–8°C. Los reactivos son estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando hayan sido almacenados en las condiciones correctas.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Micropipetas de precisión y micropipetas multidispensadoras
- Puntas de pipeta desechables
- Probetas graduadas para la solución de lavado
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 450 nm)
- Lavador de microplacas, manual, semiautomática o automática
- Usar sólo agua destilada o desionizada para preparar los reactivos de la prueba
- Vortex o equivalente
- Cubiertas de placas (tapa, papel de aluminio o adhesivo, etc)
- Centrífuga (2000 x g)
- Agitador de placas
- Cámara húmeda/Incubadora capaz de mantener una temperatura de +37°C (± 3°C)
- Placas no tapizadas o tubos para la preparación de la muestra

Precauciones y advertencias

- Considerar todo material biológico como potencialmente infeccioso cuando se manipule.
- Usar guantes de protección / prendas de protección / gafas o protección de la cara al manipular muestras y reactivos.
- Consultar la Ficha de Datos de Seguridad de Materiales del producto para obtener información adicional.
- Consultar al final de este protocolo para los peligros y medidas de prevención relacionados con los reactivos.

Prácticas de laboratorio

- Los resultados óptimos se obtendrán siguiendo estrictamente este protocolo. El pipeteo cuidadoso, la coordinación y el lavado durante todo este procedimiento son necesarios para mantener la precisión y exactitud. Usar una punta de pipeta diferente para cada muestra y control.
- No exponer las soluciones TMB a la luz fuerte o a cualquier agente oxidante. Manejar el Substrato TMB con material de cristal limpio o material plástico.
- Todos los desechos deben descontaminarse adecuadamente antes de ser eliminados. Desechar el contenido de conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- Extremar la precaución para evitar la contaminación de los componentes del kit. No verter los reactivos no utilizados de nuevo en contenedores.
- No utilizar los kits pasada su fecha de caducidad y no mezclar componentes de kits con número de lote distintos.

Preparación de los reactivos



Controles y Muestras

La dilución de los Controles y de las Muestras depende del protocolo de incubación elegido y debe de realizarse en una placa de pre-dilución o en tubos:

- Incubación corta (1 hora (\pm 5 min.) a $+37^{\circ}\text{C}$ (\pm 3°C)): pre-diluir los Controles y las Muestras 1:20 con Solución Tampón de Dilución n.º2.
- Incubación larga (16–24 horas a $2-8^{\circ}\text{C}$): pre-diluir los Controles y las Muestras 1:50 con la Solución Tampón de Dilución n.º 2.



Solución de Lavado

La Solución de Lavado Concentrada (10X) n.º2 debe de diluirse 1:10 con agua destilada antes de ser usada (por ej. 30 ml de Solución de Lavado Concentrada (10X) n.º2 en 270 ml de agua destilada).

Esta solución se conoce como "Solución de Lavado".

Nota: La Solución de Lavado Concentrada (10X) n.º2 debe alcanzar $18-26^{\circ}\text{C}$ antes de ser utilizada y debe agitarse suavemente para asegurar la disolución de cualquier sal precipitada. Después de diluir, la Solución de Lavado puede guardarse 3 días a $2-8^{\circ}\text{C}$

Conjugado

Diluir el Conjugado Concentrado (100X) 1:100 con la Solución Tampón de Dilución n.º 1.

Nota: El conjugado diluido puede guardarse 8 horas a $18-26^{\circ}\text{C}$.

Procedimiento de la Prueba

Debe dejarse que todos los reactivos adquieran 18–26°C antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos suavemente.

1 Tomar la placa(s) tapizada(s) y marcar la posición de la muestra.



2 Distribución de las muestras y los controles:

Incubación corta (1 hora (\pm 5 min.) a +37°C (\pm 3°C)):

- Dispensar 100 μ l de Control Negativo NO DILUIDO en un pocillo apropiado.
- Dispensar 100 μ l de Control Positivo NO DILUIDO en dos pocillos apropiados.
- Dispensar 100 μ l de cada muestra NO DILUIDA en el resto de los pocillos.
- Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
- Cubrir la microplaca e incubar 1 hora (\pm 5 min.) a +37°C (\pm 3°C).

Incubación larga (16-24 horas a 2–8°C):

- Dispensar 100 μ l de Control Negativo DILUIDO en un pocillo.
 - Dispensar 100 μ l de Control Positivo DILUIDO en dos pocillos.
 - Dispensar 100 μ l de cada muestra a analizar DILUIDA por pocillo.
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca e incubar 16–24 horas a 2–8°C.
-

3 Eliminar el contenido líquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μ l de Solución de Lavado 3 veces. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente. Después del lavado final, eliminar el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente.

4 Dispensar 100 μ l de Conjugado DILUIDO en cada pocillo.

5 Cubrir la microplaca e incubar 30 minutos (\pm 3 min.) a +37°C (\pm 3°C).

6 Repetir el paso n.º3.

7 Dispensar 100 μ l de Substrato TMB n.º13 en cada pocillo.

8 Incubar 20 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C lejos de la luz directa.

9 Dispensar 100 μ l de Solución de Frenado n.º3

10 Leer las densidades ópticas a 450 nm (OD.450).

11 Calcular los resultados.

Notas: Cuando se utilizan robots, la incubación de microplacas en las incubadoras hace que no sea necesario el uso de cubiertas. Cuide de no golpear ni sacudir la microplaca cuando utilice un robot. Las lecturas pueden hacerse hasta 1 hora después de la distribución de la Solución de Frenado n.º3 si las microplacas son mantenidas en oscuridad.

12 Cálculos:

Controles

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 (A450) + CP2 (A450)}{2}$$

Criterios de Validación

$$CP\bar{x} \geq 0,350$$

$$CP\bar{x} : CN(A450) \geq 3,00$$

En los ensayos no válidos, debe sospecharse de la técnica, y el ensayo tiene que repetirse siguiendo una revisión meticulosa del protocolo suministrado con el producto.

Muestras

$$M/P \% = \frac{\text{Muestras (A450)} - CN (A450)}{CP\bar{x} - CN(A450)}$$



13 Interpretación:

Muestras individuales de suero y plasma

Negativo

Positivo

$$M/P \% \leq 60$$

$$M/P \% > 60$$

Mezclas de Sueros

Negativo

Positivo

$$M/P \% \leq 40$$

$$M/P \% > 40$$

Nota: IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de resultados y la elaboración de resúmenes de datos.

Para asistencia técnica:

IDEXX EE.UU. Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte al representante local o distribuidor IDEXX o visite: idexx.com/contactlpd

N.º de registro: 1285-RD

IDEXX y Test With Confidence son marcas o marcas registradas de IDEXX Laboratories, Inc. o sus filiales en los Estados Unidos de América y/o en otros países.

© 2014 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das bovine Leukose-Virus

Gebrauchsinformation. In-vitro-Diagnostikum. Nur zum tierärztlichen Gebrauch.

Name und Verwendungszweck

IDEXX Leukosis Serum Screening ist ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen das Enzootische Rinderleukose Virus (BLV) in Einzelerum- und Plasmaproben und in gepoolten Serumproben (maximum 10) von Rindern.

Allgemeine Informationen

Die Enzootische Rinderleukose ist eine weltweit verbreitete infektiöse lymphoproliferative Rinderkrankheit. Diese Krankheit wird durch ein exogenes Delta-Retrovirus, dem Enzootischen Bovinen Leukosevirus, hervorgerufen, welches eine anhaltende Infektion einer Lymphozyten B Subpopulation durch die Integration der Provirus-RNA in bestimmte Regionen der zellulären DNA verursacht. Die meisten infizierten Rinder zeigen keine Symptome. Aber etwa 30 % der infizierten Tiere entwickeln persistente Lymphozytosen und ein geringer Anteil der Tiere (weniger als 10%) kann lymphoide Tumore entwickeln. Die Krankheit betrifft vor allem Milchherden und die Ansteckung erfolgt vor allem horizontal über Blut oder infizierte Lymphozyten enthaltende Sekrete. Es existieren weder Medikamente noch Impfungen; die Prophylaxe der Enzootischen Rinderleukose beruht auf der Früherkennung und systematischen Tötung der infizierten Tiere. Diese Früherkennung beruht vor allem auf dem Nachweis spezifischer Antikörper gegen das BLV. Anfangs wurde diese serologische Früherkennung mittels des AGID Tests (Agarose-Immudiffusionstest) durchgeführt. Die Sensitivität dieses Tests ist jedoch begrenzt und mehrere Studien zeigten, dass Tiere existieren, deren Antikörpertiter unterhalb der Nachweisgrenze des AGID Tests liegt. Aus diesem Grund wird der ELISA, eine simple, schnelle und sensitive Methode zur Herdenüberwachung eingesetzt.

Beschreibung des Testprinzips

Mikrotiterplatten sind mit BLV Antigen beschichtet. Die zu untersuchenden Proben werden verdünnt und zur Inkubation in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Liegen BLV-spezifische Antikörper in den zu testenden Proben vor, werden die Antikörper als Antigen-Antikörper Immunkomplexe am Boden der Mikrotiterplatten gebunden. Nach dem Waschen wird ein enzymgekoppelter anti-Rind-Antikörper (Konjugat) hinzugefügt. Dieser wird von Antigen-Antikörper Immunkomplexen gebunden. Nach dem Waschen wird das Enzymsubstrat (TMB) zugesetzt. Bei Anwesenheit des Enzyms wird das Substrat oxidiert und in einen blauen Farbstoff umgewandelt, der nach dem Stoppen der Reaktion gelb wird. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zu der anti-BLV Konzentration in den zu untersuchenden Proben. Über die diagnostische Bewertung entscheidet der Vergleich zwischen Proben und Kontrollen.

Reagenzien

Menge

		5	10
1	Mit BLV-Antigen beschichtete Testplatte (inaktiviert)		
2	Positive Kontrolle	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
3	Negative Kontrolle	1 x 1,0 ml	1 x 1,0 ml
4a	Konjugatkonzentrat (100X)	1 x 1,5 ml	1 x 1,5 ml
4b	Verdünnungspuffer Nr.1	1 x 120 ml	1 x 120 ml
5	Verdünnungspuffer Nr.2	1 x 120 ml	2 x 120 ml
A	TMB-Substrat Nr.13	1 x 60 ml	1 x 120 ml
B	Stopplösung Nr.3	1 x 60 ml	1 x 120 ml
C	Waschkonzentrat (10X) Nr.2	2 x 100 ml	4 x 100 ml



Hinweis: Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die im Text und auf den Etiketten verwendeten Symbole erläutert.

Lagerung

Reagenzien bei 2–8°C lagern. Bei entsprechender Lagerung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum stabil.

Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Präzisionspipetten und Multikanalmikropipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Graduierter Zylinder für die Waschlösung
- Photometer (für 96 Vertiefungen, ausgestattet mit 450 nm Messfilter)
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Zur Vorbereitung der Reagenzien nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser verwenden
- Vortex-Mischer oder gleichwertiger Mischer
- Abdeckungen für Mikrotiterplatten (Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie)
- Zentrifuge 2000 x g
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Feuchte Kammer / Inkubator für eine konstante Temperatur von +37°C (±3°C)
- Unbeschichtete Mikrotiterplatten oder Röhren für die Probenvorbereitung

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Alle biologischen Substanzen als potenziell infektiös behandeln.
- Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz oder Gesichtsschutz beim Umgang mit Proben und Reagenzien verwenden.
- Weitere Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten.
- Nähere Informationen zur Reagenziensicherheit und Vorsichtsmaßnahmen befinden sich am Ende der Gebrauchsinformation.

Laborpraktiken

- Bei strikter Einhaltung dieser Anweisungen werden optimale Ergebnisse erzielt. Sorgfältiges Pipettieren und Waschen und eine genaue Zeiteinteilung während der Testdurchführung sind notwendig, um die Genauigkeit der Werte zu gewährleisten. Für jede Probe und Kontrolle eine neue Pipettenspitze benutzen.
- Substrat nicht starkem Licht oder oxidierenden Mitteln aussetzen. Nur saubere Glas- oder Plastikbehälter benutzen.
- Alle Abfälle vor der Entsorgung ordnungsgemäß dekontaminieren. Den Inhalt im Einklang mit den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
- Eine Verunreinigung der Bestandteile des Testkits sorgfältig vermeiden. Keine unbenutzten Reagenzien zurück in die Originalflaschen schütten.
- Die Bestandteile nicht nach Ablauf des Verfalldatums benutzen und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischen.

Vorbereitung der Reagenzien



Kontrollen und Proben

Die Verdünnung der Kontrollen und der Proben hängt vom Protokoll der Inkubation ab:

- Kurzinubation (1 Stunde (\pm 5 Min.) bei $+37^{\circ}\text{C}$ (\pm 3°C)): Proben und Kontrollen im Verhältnis 1:20 mit Verdünnungspuffer Nr.2 vorverdünnen.
- Inkubation über Nacht (16–24 Stunden bei $2-8^{\circ}\text{C}$): Proben und Kontrollen im Verhältnis 1:50 mit Verdünnungspuffer Nr.2 vorverdünnen.



Waschlösung

Das Waschkonzentrat (10X) vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem/demineralisiertem Wasser verdünnen (z.B.: 30 ml Waschkonzentrat mit 270 ml destilliertem Wasser verdünnen). Diese Lösung wird in der Folge "Waschlösung" genannt.

Anmerkung: Das Waschkonzentrat (10X) vor Gebrauch auf $18-26^{\circ}\text{C}$ bringen und durch leichtes Schütteln mischen werden, um ausgefällte Salze aufzulösen. Die Waschlösung ist nach der Verdünnung 3 Tage bei $2-8^{\circ}\text{C}$ haltbar.

Konjugat

Das Konjugatkonzentrat 1:100 mit Verdünnungspuffer Nr.1 verdünnen.

Anmerkung: Diese Lösung ist nach der Verdünnung 8 Stunden bei $18-26^{\circ}\text{C}$ haltbar.

Testanweisung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf 18–26°C gebracht werden. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen.

1 Die beschichteten Mikrotiterplatten hernehmen und die Position der Proben auf einem Arbeitsblatt notieren.



2 Proben und Kontrollen wie folgt in die Vertiefungen pipettieren:

Kurzinkubation (1 Stunde (\pm 5 Min.) bei +37°C (\pm 3°C)):

- 100 μ l VERDÜNNTES negative Kontrolle in eine Vertiefung geben.
- 100 μ l VERDÜNNTES positive Kontrolle in zwei Vertiefungen geben.
- 100 μ l von jeder VERDÜNNTEN Probe in die restlichen Vertiefungen geben.
- Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
- Die Mikrotiterplatten abgedeckt 1 Stunde (\pm 5 Min.) bei +37°C (\pm 3°C).

Über Nacht Inkubation (16–24 Stunden bei 2–8°C):

- 100 μ l VERDÜNNTES negative Kontrolle in eine Vertiefung.
 - 100 μ l VERDÜNNTES positive Kontrolle in zwei Vertiefungen.
 - 100 μ l von jeder VERDÜNNTEN Probe in eine entsprechende Vertiefung.
 - Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten Schüttler mischen.
 - Die Mikrotiterplatten abgedeckt für 16–24 Stunden bei 2–8°C inkubieren.
-

3 Den flüssigen Inhalt aus den Vertiefungen absaugen und sodann mit etwa 300 μ l Waschlösung dreimal waschen. Dabei ein Austrocknen der Platte zwischen den Waschrufen und der Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden. Nach dem letzten Waschen die Platte auf saugfähigem Material ausklopfen, um verbleibende Restflüssigkeit zu entfernen.

4 100 μ l VERDÜNNTES Konjugat in jede Vertiefung geben.

5 Die Mikrotiterplatte abgedeckt 30 Minuten (\pm 3 Min.) bei +37°C (\pm 3°C) inkubieren.

6 Schritt 3 wiederholen.

7 100 μ l TMB-Substrat Nr.13 in jede Vertiefung geben.

8 Die Mikrotiterplatte 20 Minuten (\pm 3 Min.) bei 18–26°C vor direktem Licht geschützt inkubieren.

9 100 μ l Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung geben.

10 Messen und Notieren der optischen Dichte der Proben und Kontrollen bei 450 nm.

11 Berechnung der Ergebnisse.

Anmerkung: Bei Verwendung von Robotern zur ELISA Abarbeitung ist eine Inkubation mit Mikrotiterplattenabdeckung nicht nötig. Das Schütteln und Ausklopfen der Mikrotiterplatte ist bei der Abarbeitung mittels Roboter nicht möglich. Die Messung kann bis zu 1 Stunde nach der Zugabe der Stopplösung Nr.3 erfolgen, wenn die Mikrotiterplatte bis dahin im Dunkeln aufbewahrt wird.

12 Berechnungen:

Kontrollen

$$PK\bar{x} = \frac{PK1 (A450) + PK2 (A450)}{2}$$

Validitätskriterien

$$PK\bar{x} \geq 0,350$$

$$PK\bar{x} : NK(A450) \geq 3,00$$

Ungültige Ergebnisse sind möglicherweise auf eine nicht sachgemäße Durchführung zurückzuführen. Der Test sollte nach erneutem, sorgfältigem Durchlesen der Gebrauchsinformation wiederholt werden.

Proben

$$P/PK \% = \frac{\text{Probe (A450)} - NK (A450)}{PK\bar{x} - NK(A450)}$$



13 Interpretation:

Einzelserum- und Plasmaproben

Negativ

$$P/PK \% \leq 60$$

Positiv

$$P/PK \% > 60$$

Gepoolte Serumproben

Negativ

$$P/PK \% \leq 40$$

Positiv

$$P/PK \% > 40$$

Hinweis: IDEXX bietet auch Geräte und Softwaresysteme zur Berechnung der Ergebnisse und zur Datenverarbeitung an.

Technische Unterstützung:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 oder +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter oder besuchen Sie unsere Webseite: idexx.com/contactlpd

Zul.-Nr.: BGAF-B 103

IDEXX und Test With Confidence sind Schutzmarken oder eingetragene Schutzmarken von IDEXX Laboratories, Inc. oder eines Tochterunternehmens von IDEXX in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern.

© 2014 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

WARNING / ATTENTION / ATENCIÓN / ATENÇÃO / ACHTUNG



H316 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313

Positive control / Negative Control – Causes mild skin irritation. Causes serious eye irritation. Wear protective gloves/eye protection/face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Contrôle positif / Contrôle négatif – Provoque une légère irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Controle Positivo / Controle Negativo – Causa uma irritação suave da pele. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Control Positivo / Control Negativo – Provoca una leve irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes/gafas/máscara de protección. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

Positive Kontrolle / Negative Kontrolle – Verursacht milde Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

H319 / P280 / P337+P313 / EUH208

Dilution Buffer N.2 – Causes serious eye irritation. Wear eye protection/face protection. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Contains MIT. May produce an allergic reaction.

Tampon de dilution N°2 – Provoque une sévère irritation des yeux. Porter un équipement de protection des yeux/du visage. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Contient MIT. Peut produire une réaction allergique.

Tampão de Diluição No.2 – Provoca irritação ocular grave. Usar protecção ocular/protecção facial. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Contém MIT. Pode provocar uma reacção alérgica.

Solución Tampón de Dilución n.º2 – Provoca irritación ocular grave. Llevar gafas/máscara de protección. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Contiene MIT. Puede provocar una reacción alérgica.

Verdünnungspuffer Nr.2 – Verursacht schwere Augenreizung. Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Enthält MIT. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313

TMB Substrate – Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. Wear protective gloves/eye protection/face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Substrat TMB – Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Substrato TMB – Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Substrato TMB – Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes/gafas/máscara de protección. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

TMB-Substrat – Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

H302 / H315 / H317 / H319 / H335 / P280 / P333+P313 / P337+P313 / P363

Stop solution – Harmful if swallowed. Causes skin irritation. May cause an allergic skin reaction. Causes serious eye irritation. May cause respiratory irritation. Wear protective gloves/eye protection/face protection. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Wash contaminated clothing before reuse.














Solution d'arrêt – Puet être nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.

Solução de Interrupção – Nocivo por ingestão. Provoca irritação cutânea. Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.

Solución de Frenado – Nocivo en caso de ingestión. Provoca irritación cutánea. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Provoca irritación ocular grave. Puede irritar las vías respiratorias. Llevar guantes/gafas/máscara de protección. En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.

Stopplösung – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht Hautreizungen. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Verursacht schwere Augenreizung. Kann die Atemwege reizen. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descrições do símbolos Descripciones de los símbolos / Symbol-Beschreibungen / Descrizione dei simboli

	Batch Code (Lot) / Numéro de lot / Código de lote (Lote) Número de Partida (Lote) / Chargenbezeichnung (Ch.-B.) / Codice del lotto (partita)
	Serial Number / Numéro de série / Número de série Número de serie / Seriennummer / Numero di serie
	Catalog Number / Numéro de catalogue / Número de catálogo Número de catálogo / Katalognummer / Numero di catalogo
	In vitro diagnostic / Diagnostic in vitro / Diagnóstico in-vitro Diagnóstico in-vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostico in vitro
	Authorized Representative in the European Community Représentant agréé pour la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Européia Representante autorizado en la Comunidad Europea Autorisierte EG-Vertretung Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Positive Control / Contrôle positif / Controle Positivo Control Positivo / Positive Kontrolle / Controllo Positivo
	Negative Control / Contrôle négatif / Controle Negativo Control Negativo / Negative Kontrolle / Controllo Negativo
	Use by date / À utiliser avant la date / Data de Vencimento Usar antes de / Verwendbar bis / Usare entro
	Date of manufacture / Date de fabrication / Data de Fabricação Fecha de fabricación / Herstellungsdatum / Data di produzione
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante Fabricante/ Hersteller / Ditta produttrice
	Temperature limitation / Limite de température Limite de temperatura / Límite de temperatura Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation Consulte instruções para o uso / Consultar las instrucciones de uso Gebrauchsinformation beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	Major change in the user instructions Modification majeure du mode d'emploi Modificações importante nas instruções de uso Modificación importante en el manual de instrucciones Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation Modifica importante nell'inserto tecnico

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Manufacturer
IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra
34090 Montpellier
France

EU-Representative
IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
The Netherlands

idexx.com

IDEXX