



AGROLABO

FeLV Ag ELISA 96 wells

FeLV Ag ELISA 96 wells

Kit ELISA per la determinazione degli antigeni del Virus della Leucemia felina in campioni di siero o plasma di gatto

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è basato sulla tecnica ELISA a doppio anticorpo monoclonale.

Un anticorpo monoclonale specifico anti-p27 del Virus della Leucemia felina (FeLV) è adesso ai pozzetti della piastra. Se il campione in esame contiene l'antigene p27 del FeLV (campione positivo), questo antigene si legherà all'anticorpo adesso. Aggiungendo un secondo anticorpo monoclonale anti-p27 FeLV, coniugato con perossidasi di rafano, questo si legherà al complesso Ab-Ag. Dopo un altro ciclo di lavaggi per eliminare tutto il materiale non legato, viene aggiunto il substrato che si legherà al coniugato, sviluppando una reazione colorimetrica.

COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti);
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso;
- 1 flacone di controllo negativo - pronto all'uso;
- 1 flacone di coniugato - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 10X;
- 1 flacone di substrato (TMB) - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di stop - pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT

Pipette di precisione e puntali; spettrofotometro con filtro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

PRECAUZIONI

1. Leggere attentamente le istruzioni.
2. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20-25°C) prima dell'uso.
3. Non utilizzare reagenti e istruzioni di altri kit.
4. Il substrato è molto sensibile alla luce e alle contaminazioni. Non inserire il puntale direttamente nel flacone. La soluzione di stop è un acido forte diluito. Maneggiare i due reagenti con cura.
5. Non utilizzare i reagenti dopo la loro data di scadenza.
6. Non fumare, bere o mangiare nei locali adibiti all'uso.
7. In ogni analisi utilizzare sempre il controllo positivo e negativo.
8. Utilizzare un puntale nuovo per ciascun campione da analizzare.
9. Rispettare i tempi di ciascuna incubazione.
10. Preparare i campioni secondo le istruzioni.
11. Evitare ogni contaminazione dei reagenti.
12. Tutti i componenti devono essere conservati a +2-8°C.

LAVAGGIO DEI POZZETTI

Le operazioni di lavaggio possono essere effettuate con un lavatore automatico di piastre o con una pipetta multicanale in modo da dispensare un volume di 300 µl in ogni pozzetto. Dopo le incubazioni, le operazioni di lavaggio devono essere effettuate seguendo queste istruzioni:

- rovesciare il contenuto dei pozzetti in un apposito contenitore, con un movimento deciso al fine di evitare la contaminazione tra pozzetti adiacenti,
- dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto,
- agitare delicatamente la piastra, evitando contaminazione tra i pozzetti vicini,
- rovesciare la piastra per svuotare i pozzetti,
- ripetere il lavaggio tante volte quante indicate nelle istruzioni del kit,
- prima dell'ultima operazione di rovesciamento della piastra, accertarsi che il reagente da utilizzare di seguito sia pronto,
- non lasciare i pozzetti asciutti più del tempo necessario per dispensare il reagente del passaggio successivo,
- dopo l'ultimo passaggio di lavaggio la piastra deve essere asciugata su un foglio di carta assorbente.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di siero o plasma di gatto.

Non è necessaria alcuna diluizione del campione. Dispensare direttamente 50 µl di campione in ogni pozzetto.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio

Diluire 1 parte di soluzione di lavaggio concentrata fornita con 9 parti di acqua distillata o deionizzata (es. 100 ml di soluzione di lavaggio concentrata in 900 ml di acqua). Una volta diluita, la soluzione di lavaggio può essere conservata a +2-8°C.

PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit prima di eseguire l'analisi.
2. Distribuire 50 µl di ciascun campione e dei controlli in ogni pozzetto. Aggiungere poi 50 µl di coniugato seguendo l'ordine con cui sono stati dispensati i campioni ed i controlli. Agitare delicatamente la piastra per consentire una corretta miscelazione dei reagenti.
Coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente.
3. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio descritta nel paragrafo precedente.
4. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di substrato.
Coprire ed incubare la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente.
5. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop.
6. Misurare il valore di assorbanza di ogni pozzetto (OD) con un lettore di piastre alla lunghezza d'onda di 450 nm.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 450 nm. Se i campioni sono stati testati in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica dell'assorbanza dei 2 pozzetti.

Validazione del test

Il test è considerato valido se:

Controllo positivo: $OD > 1$

Controllo negativo: $OD < 0,2$

Determinazione dei valori di CUT-OFF:

Cut-off positivo = $OD \text{ controllo negativo} + 0,25$

Cut-off negativo = $OD \text{ controllo negativo} + 0,20$

Interpretazione dei risultati:

Campioni Positivi:

campioni il cui valore di assorbanza è superiore al valore del cut-off positivo.

Campioni Negativi:

campioni il cui valore di assorbanza è inferiore al valore del cut-off negativo.

Campioni Dubbi:

campioni i cui valori di assorbanza sono compresi tra i due cut-off. In questo caso si consiglia di ripetere il test dopo 3-4 settimane.

FeLV Ag ELISA 96 wells

Kit ELISA for the detection of Feline Leukemia Virus antigen in feline serum or plasma samples

TEST PRINCIPLE

The test is performed as a double antibody sandwich enzymatic immunoassay. A specific monoclonal antibody (Mab) against the p27 protein of Feline Leukemia Virus (FeLV) is fixed on the wells of the plate. When a sample containing the p27 antigen of FeLV (positive sample) is added, the antigen will bind to the Mab adsorbed. By adding a second Mab anti-FeLV p27, conjugated with horseradish peroxidase, this will bind to Ab-Ag complex. All non-fixed material is removed by washing. A specific substrate is then added to the wells which causes a color change reaction when the conjugate is present.

TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 wells);
- 1 dropper of positive control - ready for use;
- 1 dropper of negative control - ready for use;
- 1 dropper of conjugate - ready for use;
- 1 bottle of washing solution - 10X;
- 1 dropper of substrate (TMB) - ready for use;
- 1 dropper of stop solution - ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Precision pipettes and tips; spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

PRECAUTIONS

1. Read the instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (+20-25°C) prior to use.
3. Do not substitute or mix instructions or reagents from different kits or lots.
4. The substrate is very sensitive to the light and to contaminations. Do not use the tip directly in the vial. The stop solution is a diluted strong acid. Handle the two reagents with care.
5. Do not use components after expiry dates.
6. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled.
7. In each utilization of the kit the positive and negative controls must be tested.
8. Use a new tip for each sample.
9. Observe each incubation time.
10. Prepare each sample according to instructions.
11. Avoid any contamination of the reagents.
12. All kit components must be stored at +2-8°C.

WASHING STEPS

The washing steps may be carried out using an automated plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well. After the incubation, the washing steps should be carried out according to the following instructions:

- throw out the content of the plate by vigorously turning the plate over to avoid the possible mixture of the content from one well to another,
- dispense a volume of 300 µl of wash buffer into each well,
- shake the plate gently, avoiding contamination between wells,
- turn over the plate and tap the wells vigorously to remove the wash buffer,
- repeat the process as many times as is indicated by the kit's instructions,
- prior to emptying out the plate's contents during the final washing step, ensure that the next reagent to be added to the plate is ready to use,
- the wells should not be left dry for any longer than strictly necessary in order to dispense the reagent of the following step,
- after the last washing step, blot the empty wells face down on clean paper towels or absorbent paper to remove residual wash buffer.

PREPARATION OF SAMPLES

Feline serum or plasma samples.

Dilution of the samples is not necessary. Directly add 50 µl of sample to each well.

PREPARATION OF REAGENTS

Wash buffer solution:

Dilute one part of the wash buffer supplied into 9 parts of distilled or deionized water (ie. 100 ml of concentrated wash buffer with 900 ml of water). Once diluted, the wash buffer solution may be stored at +2-8°C.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature before use.
2. Dispense 50 µl of positive and negative control in two different wells. Add 50 µl of each sample on the remainder wells of the plate. Dispense 50 µl of conjugate to each well (controls and samples). Delicately shake the plate.
Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes.
3. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
4. Add 100 µl of substrate solution to each well.
Seal the plate and incubate at room temperature for 5 minutes.
5. Add 100 µl of stop solution to each well.
6. Measure the absorbance value of each well with a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The reading of the absorbance values (OD) must be carried out at a wavelength of 450 nm. If you run the samples or controls in duplicate wells, the OD values for the samples or controls will be the mean of both wells.

Test Validation:

The test is to be considered valid when:

Positive Control: OD > 1

Negative Control: OD < 0.2

CUT-OFF value determination:

Positive Cut-off = OD negative control + 0.25

Negative Cut-off = OD negative control + 0.20

Interpretation of the results

Positive Samples: samples with an OD higher than the positive cut-off value.

Negative Samples: samples with an OD lower than the negative cut-off value.

Doubtful Samples: samples with an OD between both cut-off values. In these cases, it is suggested to repeat the test after 3-4 weeks.



AGROLABO

Manufactured by;

Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories

and Production Centre

Diagnostic Division

Via Masero 59

10100 Scarmagno (TO)

Italy

Tel +39 0125 731111

Fax +39 0125 731190

E-mail agrolabo@agrolabo.it

www.agrolabo.it

shop.agrolabo.it