

ID Screen®IBR gB Kompetitivní

****

Souprava pro detekci protilátek gB BHV-1 kompetitivní ELISA

metodou v séru a plazmě skotu nebo buvolů.

Krátký a přes noc protokol.

Pro použití *in vitro*

IBRGBC ver 0312GB

**Návod k použití**

|  |  |
| --- | --- |
| **Výrobce** | **Výhradní zástupce v ČR a SR** |
|  |  |  |
|  **IDvet** | **O.K.SERVIS BioPro, s.r.o.**Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9Česká republikainfo@oks.cz[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz) | **O.K.SERVIS BioPro SK, s.r.o.**Bulharská 70, 821 04 Bratislava Slovenská republikabratislava@oks.cz[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz) |

**Obsah**

[1. Obecné informace 3](#_Toc381887747)

[2. Popis testu 3](#_Toc381887748)

[3. Obsah soupravy 3](#_Toc381887749)

[4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy 3](#_Toc381887750)

[5. Upozornění 4](#_Toc381887751)

[6. Příprava vzorku 4](#_Toc381887752)

[7. Validace 5](#_Toc381887753)

[8. Vyhodnocení 5](#_Toc381887754)

[Dodatek – Kontakty 6](#_Toc381887755)

# Obecné informace

Tato diagnostická souprava je určena pro detekci protilátek proti gB glykoproteinu viru BHV-1 metodou kompetitivní ELISA. Test je kalibrován tak, aby detekoval EU2 (slabě pozitivní) standardní sérum.

# Popis testu

Jamky jsou potaženy virem BHV-1. Vzorky, které mají být testovány a kontroly jsou přidány do jamek. Protilátky proti gB, pokud jsou přítomny, tvoří komplex protilátka-antigen, který obsadí epitopy gB. Anti-gB-křenová peroxidáza (HRP) je přidána do jamek. Obsadí zbývající volné gB epitopy a vytvoří antigen-konjugát –peroxidázový komplex.

Po promytí, aby se eliminoval přebytečný konjugát, se přidá roztok substrátu (TMB).

Výsledné zbarvení závisí na množství specifických protilátek přítomných ve vzorku, který je testován:

* v nepřítomnosti protilátek se objeví modrá barva roztoku, která zežloutne po přidání zastavovacího roztoku (Stop roztok).
* v přítomnosti protilátek je roztok bez zbarvení.

Mikrotitrační destičky vyhodnoťte při 450 nm.

# Obsah soupravy

**Činidla Množství**

Mikrotitrační destičky s BHV-1 lyzátem 4

Konjugát – anti gB-HRP(10X) 6 ml

Pozitivní kontrola 1 ml

Negativní kontrola 1 ml

Ředicí pufr 19 60 ml

Ředicí pufr 2 60 ml

Promývací koncentrát (20X) 60 ml

Substrátový roztok 60 ml

Stop roztok (H2SO4 0,5 M) 60 ml

1. Konjugát, kontroly a substrátový roztok musí být skladovány při teplotě 5°C- 3°C) .
2. Další činidla mohou být uložena mezi 2 °C a +26 °C.
3. Komponenty nesoucí stejný název *(mycí* *roztok, ředicí pufry),* mohou být použity pro celý ID Vet sortiment produktů.

# 4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

1. Jedno nebo více-kanálové mikropipety o objemech 10 ul, 100 ul a 200 ul.
2. Jednorázové špičky.
3. 96-ti jamková odečítačka.
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
5. Manuální nebo automatický vymývací systém.

# 5. Upozornění

1. Nepipetujte ústy.
2. Roztok substrátu může dráždit kůži.
3. Stop roztok (H2SO4 0,5 M) může způsobit vážné popáleniny **(R35).** V případě kontaktu s pokožkou nebo zasažení očí, okamžitě omyjte velkým množstvím vody a poraďte se s lékařem **(S26).**
4. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu, ani působení oxidačních činidel.
5. Všechen materiál na jedno použití, použitý pro testy by měl být dekontaminován ponořením do čerstvě připraveného 5% roztoku

# Příprava vzorku

Aby se zabránilo rozdílům v inkubační době mezi vzorky, je možné připravit 96-ti jamkovou destičku obsahující testované a kontrolní vzorky, než se přenesou do mikrotitrační ELISA destičky s pomocí vícekanálové pipety.

**Příprava promývacího roztoku**

Pokud je to nutné, přeneste promývací koncentrát **(20X)** do místnosti s pokojovou

teplotou a důkladně promíchejte. Promývací koncentrát musí být zcela rozpuštěný.

Připravte promývací roztok **(1X)** zředěním promývacího koncentrátu **(20x)**

 v destilované nebo deionizované vodě.

**Postup**

Nechte všechny reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu před použitím. Homogenizujte všechny reagencie převracením nebo na Vortexu. Tato zkouška může být provedena buď s krátkou dobou inkubace séra nebo inkubací séra přes noc.

**Pro krátkou inkubaci:**

1.Přidejte:

- 50 ul pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 50 ul negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 50 ul každého vzorku, který má být testován do zbývajících jamek.

2. Inkubujte **45 min.**  **3 min.** při 37 ° C  2 ° C).

**Pro inkubaci přes noc:**

Vzorky se zředí na 1/5. Postupuje se například následujícím způsobem:

1. Přidejte 80 ul  **ředicího pufru 19** do každé jamky,následně dejte:

-20 ul **pozitivní** **kontroly** do jamek A1 a B1.

-20 ul **negativní** **kontroly** do jamek C1 a D1.

-20 ul každého testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Inkubujte **přes noc (16** - 20 hodin) při teplotě 21 ° C  5 ° C).

**Pro oba postupy (krátká i noční inkubace) NEVYPRAZDŇUJTE ani NEPROMÝVEJTE obsah destiček.**

3. Připravte **konjugát 1X** zředěním **Konjugátu 10X** v poměru **1/10 ředicím pufrem 2.**

4. Přidejte 100 ul **konjugátu** **1X** do každé jamky.

5. Inkubujte **30 min**  **3 min** při 37 ° C  2 ° C).

6. Vyprázdněte destičku a  3 krát každou jamku vymyjte

cca 300 ul **promývacího roztoku.**

7. Přidejte 100 ul **substrátového roztoku** do každé jamky.

8. Inkubujte **15 min**  **2 min** při 21 ° C  5 ° C) ve tmě.

9. Přidejte 100 ul **zastavovacího** **roztoku(Stop roztok)** do každé jamky

aby se zastavila reakce.

10. Odečtěte a zaznamenejte OD při 450 nm.

# Validace

Zkouška je vyhovující, pokud:

Střední hodnota negativní kontroly OD

(ODNC) je větší než 0,7.

**ODNC** **> 0.7**

Střední hodnota pozitivní kontroly (ODPC) je menší než 30% ODNC

**ODPC/ ODNC** **< 0,3**

# Vyhodnocení

Pro každý vzorek vypočítejte procento kompetice(kompetice %):

 ODvzorku

kompetice % = -------------------------------- x 100

 ODNC

Pro krátkou a přes noc inkubaci:

* hodnoty menší než nebo rovnající se 50%, jsou považovány za pozitivní.
* hodnoty větší než nebo rovnající se 50% a méně než 60% jsou považovány za pochybné.
* hodnoty větší než nebo rovny 60%, jsou považovány za negativní.

**Výsledek Stav**

Kompetice% ≤  50% POZITIVNÍ

Kompetice % < 60% POCHYBNÝ

Kompetice % ≥ 60% NEGATIVNÍ

Datum vydání: březen 2014

# Dodatek – Kontakty

|  |
| --- |
| **Výrobce** |
|  |
|  |
| **Výhradní zástupce v ČR a SR** |
|  |
| **O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.****Kanceláře**: Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republikatel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@oks.cz**Servis**: Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republikatel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, servis@oks.cz**Infolinka**: +420 841 111 114www.biopro.cz |
|  |
|  |
| **O.K. SERVIS BioPro SK, s.r.o.****Kancelář:** Bulharská 70, 821 04 Bratislava, Slovenská republikatel.: +421 243 634 967, fax: +421 233 331 785bratislava@oks.cz**Servis:** tel.: +421 220 512 703 |