**SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking**

**KIT PRO DETEKCI PROTILÁTEK PROTI VIRU BVD/BD VIRU U PŘEŽVÝKAVCŮ**

**INDIVIDUAL (SKOT A KOZY)**

**INDIVIDUAL A SMĚS (OVCE)**

**IMMUNOENZYMATICKÁ TECHNIKA TYPU BLOCKING**

384 jednotlivých reakcí

|  |
| --- |
| **I. PRINCIP TESTU** |

Diagnostická souprava SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking je založena na principu jednojamkové imunoenzymatické techniky typu blocking pro detekci specifických protilátek proti proteinu společnému pro všechny kmeny viru BVD/MD a BD (p80/125 nestrukturální protein). Tyto protilátky vznikají v důsledku multiplikace viru po přirozené infekci nebo aplikaci vakcíny s živým vakcinačním virem. Test má tři základní kroky:

1. Vzorky séra nebo plasmy jsou umístěny do jamek s navázaným proteinem BVD/BD p80/125. Protilátky proti tomuto proteinu přítomné ve vzorku se specificky vážou na antigen navázaný v jamkách.

2. Po promytí je přidána monoklonální protilátka anti- BVD/BD p80/125 značená křenovou peroxidázou - konjugát. Tato se váže na volná vazebná místa a vytváří tak komplex (Ag) - (anti-BVD/BD p80/125 / peroxidáza).

3. Nadbytečný konjugát je odstraněn druhým promývacím krokem. Enzym obsažený v komplexu je aktivován přidáním substrátu, který se jeho působením transformuje na barevný produkt. Odpovídající optická denzita je změřena a interpretována následujícím způsobem:

- při nepřítomnosti protilátek ve vzorku dojde ke vzniku intenzivní barevné reakce působením enzymu konjugátu navázaném na volných vazebných místech antigenu BVD/BD p80/125 fixovaného na pevný podklad mikrotitrační destičky.

- v přítomnosti protilátek proti antigenu BVD/BD p80/125 ve vzorku se na vazebná místa naváže méně konjugátu a vznik barevné reakce je inhibován.

|  |
| --- |
| **II. SLOŽENÍ KITU A SKLADOVÁNÍ** |

|  |  |
| --- | --- |
| REAGENCIE | REKONSTITUCE A UCHOVÁNÍ |
| 4 mikrodestičky se 6 stripy 2 x 8 jamek s navázaným BVD/BD [p80/125] proteinem | Spotřebovat do 4 týdnů po otevření obalu, který musí být po každém použití uzavřen. |
| Promývací roztok (**W**) (10x koncentrovaný) | Naředit 10x destilovanou nebo demineralizovanou vodou. Spotřebovat do 48 hodin po naředění. |
| Ředící roztok na ředění vzorků (**SD**) | Připraven k použití |
| Negativní kontrola (**N**) | Připravena k použití |
| Pozitivní kontrola (**P**) | Připravena k použití |
| Ředící roztok na ředění konjugátu (**CD**) | Připraven k použití |
| Konjugát (koncentrovaný) Mab anti-BVD/BD [p80/125] / peroxidáza (**CJ**) | Naředit v CD.Spotřebovat do 24 hodin po naředění. |
| Pufrovaný peroxidázový substrát (**PS)** | Připraven k použití |
| Zastavovací roztok (**S)** | Připraven k použití |
| Krycí fólie | 12 ks |

**Upozornění**: Kit a naředěné reagencie mají být skladovány při + 5 °C ± 3 °C a používány, jak je uvedeno výše.

|  |
| --- |
| **III. MATERIÁL A REAGENCIE POTŘEBNÉ PRO TEST (NEOBSAŽENY V KITU)** |

- Destilovaná nebo demineralizovaná voda.

- Pipety s nastavitelným nebo fixním objemem pro přenášení objemů 0 až 1000 μl. Povolená odchylka měření je ≤10% pro objemy ≤10 μl a ≤ 5% pro všechny ostatní objemy.

- Odměrné válce (100 ml a 1000 ml).

- Manuální, automatická nebo poloautomatická promývačka pro mikrotitrační destičky.

- Fotometr pro mikrotitrační destičky s filtry pro bichromatické měření při 450 a 630 nm. Je možné i monochromatické měření při 450 nm.

- Inkubátor pro +37 °C ± 3 °C.

|  |
| --- |
| ***IV. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ*** |

Kvalita výsledků závisí na dodržování zásad správné laboratorní praxe stanoveného postupu (viz paragraf VI).

1. Nemíchejte nebo nespojujte reagencie z různých šarží kitů.

2. Nepoužívejte reagencie po datu exspirace.

3. Umístěte všechny reagencie do laboratorní teploty nejméně 1 hodinu před použitím.

4. Nakládejte se všemi reagenciemi a vzorky jako s biologickým rizikovým materiálem.

5. Vyvarujte se kontaktu reagencií s kůží a okem. Pokud dojde k expozici, ihned omyjte postižené místo chladnou vodou.

6. Nikdy nepipetujte ústy.

7. Zabraňte vzájemné kontaminaci vzorků při jejich odběru, skladování nebo transportu. Používejte jednorázové pipetovací špičky pro jednotlivé vzorky.

8. Zabraňte kontaminaci substrátu metalickými ionty, oxidačními agens nebo detergenty. Přesvědčte se, že používané nádoby jsou čisté. Nepoužívejte stejnou nádobku nebo pipetu pro konjugát a substrát

9. Je doporučeno likvidovat reagencie a kontaminovaný materiál podle příslušných předpisů. Bezpečnostní listy pro jednotlivé produkty jsou k dispozici na vyžádání.

**Identifikace nebezpečnosti**: Toxické při inhalaci a při požití. Způsobuje těžké poleptání. Dráždí oči, dýchací orgány a kůži. Nebezpečí vážného poškození očí. Může vyvolat senzibilizaci při vdechování a při styku s kůží. Uchovávejte obal těsně uzavřený. Zamezte styku s kůží. Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. K tomuto výrobku nikdy nepřidávejte vodu. V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc.

|  |
| --- |
| **V. VZORKY** |

Test se provádí z odstředěného séra nebo plazmy ředěného 1:10 pro vzorky skotu nebo 1:5 pro vzorky od ovcí a koz.

Vzorky ovcí mohou být testovány ve směsi až 5 individuálních vzorků a testovány v ředění 1:5.

Vzorky mají být skladovány následujícím způsobem:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| VZORKY | Chlazené(+ 5 °C) | Mražené(- 20 °C) | Laboratorní teplota(20 °C) |
| ředěné sérum nebo plazma | Max. 7 dnů | Ano | Ne |

|  |
| --- |
| **VI. POSTUP** |

Striktně dodržujte stanovený postup uvedený níže. Používejte pozitivní a negativní kontroly v duplikátech pro každé provedení testu a pro každou destičku.

**A. PŘÍPRAVNÉ KROKY**

1. Pečlivě nastavte pozice kontrol a vzorků.

2. Připravte vzorky séra nebo plazmy pro testování. Naředění může být provedeno buď v samostatné zkumavce nebo přímo v jamkách destičky.

**B. PROVEDENÍ TESTU**

**I – ROZMÍSTĚNÍ KONTROL A VZORKŮ**

**1. Rozmístění kontrol:**

Kontroly jsou připravené k použití. Po potřepání lahviček přidejte 100 μl negativní kontroly (N) do jamek A1 a A2 a 100 μl of pozitivní kontroly (P) do jamek B1 and B2.

**2. Rozmístění vzorků:**

- Přidejte 100 μl 10x ředěného séra skotu na jednu jamku. Přidejte 100 μl 5x ředěného ovčího nebo kozího séra na jednu jamku.

- Pro ředění přímo v jamkách, přidejte 90 μl roztoku pro ředění vzorků (SD) plus 10 μl bovinního séra do jamky, nebo 80 μl roztoku pro ředění vzorků (SD) plus 20 μl

ovčího nebo kozího séra do jamky a důkladně promíchejte.

- Vzorky mohou být testovány jednotlivě nebo v duplikátech.

- Stripy musí být vždy umístěny v rámečku, aby bylo možno použít promývačku a fotometr.

- Překryjte jamky adhezivní fólií upravené na potřebnou délku podle počtu použitých stripů.

- Promíchejte mírným protřepáním manuálně nebo na třepačce.

**3. Inkubace destičky:**

Inkubujte destičku přes noc (14-18 hodin) při + 5 °C ± 3°C.

**PROMÝVÁNÍ:**

Promývací pufr: nařeďte koncentrovaný promývací roztok (W) 1:10 v destilované nebo demineralizované vodě.

Opatrně odstraňte adhezivní fólii a promyjte 4x.

**II – PŘIDÁNÍ KONJUGÁTU**

**1. Příprava konjugátu:**

Připravte ředění konjugátu naředěním koncentrátu (CJ) 1:10 v ředícím roztoku pro ředění konjugátu (CD) ; 2 ml je množství potřebné pro jeden strip, tj. 200 μl CJ v 1.8 ml CD.

**2. Rozmístění konjugátu:**

Přidejte 100 μl naředěného konjugátu do všech jamek a překryjte novou adhezivní fólií.

**3. Inkubace konjugátu:**

Inkubujte 1 hodinu ± 5 min při +20 °C ± 5 °C.

**PROMÝVÁNÍ:**

Opatrně odstraňte adhezivní fólii a promyjte 4x.

**III – DETEKCE**

**1. Přidání substrátu:**

Přidejte 100 μl pufrovaného peroxidázového substrátu (**PS)** do každé jamky. Nezakrývejte adhezivní fólii.

Promíchejte mírným protřepáním manuálně nebo na třepačce.

**2. Inkubace se substrátem:**

30 min. ± 5 min. při laboratorní teplotě (+20 °C ± 5 °C), chráněné před světlem.

**3. Přidání zastavovacího roztoku:**

Přidejte 50 μl zastavovacího roztoku (S) do každé jamky.

Promíchejte mírným protřepáním manuálně nebo na třepačce. Ujistěte se, že v jamkách nejsou vzduchové bubliny.

 **4. Měření optické denzity:**

Změřte optickou denzitu (OD) bichromaticky při 450 a 630 nm nebo monochromaticky při 450 nm (v pásmu žluté). Je preferováno bichromatické měření. Pokud má být měření monochromatické, ujistěte se o čistotě spodní strany jamek před provedením měření.

|  |
| --- |
| **VII. OVĚŘENÍ VALIDITY TESTU** |

Výsledky provedeného testu jsou validní pokud:

- OD negativní kontroly (N) je ≥ 0.500, a

- procento kompetice pozitivní kontroly (P) je ≥ 70 %.

Procento kompetice se vypočítá podle následujícího vzorce:

|  |
| --- |
|  \_\_\_ \_\_\_OD N - OD P% P = --------------------------- x 100\_\_OD N |

\_\_

OD = průměrná optická denzita

|  |
| --- |
| **VIII. VYJÁDŘENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ** |

Existují dvě možnosti výpočtu a vyhodnocení výsledků:

**Metoda 1: VÝPOČET PROCENTA KOMPETICE (% S)**

Pro každý vzorek:

|  |  |
| --- | --- |
| \_\_\_ \_\_\_OD N - OD P% S = --------------------------- x 100  \_\_OD N | \_\_\_OD = průměrná optická denzita, je-li test proveden v duplikátech |

**SKOT**

Vzorek séra nebo plazmy skotu vykazující procento kompetice (% S) ≥ 50 % je hodnocen jako pozitivní.

Vzorek séra nebo plazmy skotu vykazující procento kompetice (% S) < 30 % je hodnocen jako negativní.

**OVCE / KOZY**

Individuální vzorek séra nebo plazmy ovcí vykazující procento kompetice (% S) ≥ 40 % je hodnocen jako pozitivní.

Individuální vzorek séra nebo plazmy ovcí vykazující procento kompetice (% S) < 20 % je hodnocen jako negativní.

**OVCE (směsné vzorky)**

Směsný vzorek vykazující procento kompetice (% S) < 40 je hodnocen jako negativní a ≥ 40 % je hodnocen jako pozitivní.

**Dubiózní zóna:**

Individuální vzorek séra nebo plazmy vykazující procento kompetice v DUBIÓZNÍ ZÓNĚ mezi 30 a 50 % pro vzorky skotu a 20 and 40 % pro vzorky ovcí a koz

je hodnocen jako dubiózní a je doporučeno opakované testování vorku.

Je-li dubiózní výsledek potvrzen, doporučuje se opakovaný odběr vzorku a vyšetření stejného zvířete

**Poznámka:**

- Procento kompetice pro vzorky vykazující hodnotu OD “over” nebo vyšší než 2,5 OD, je považováno za 0%.

- Určité problémy se mohou vyskytnout u zvířat mladších 6 měsíců pocházejících od matek s protilátkami proti viru BVD/BD. Rezidua kolostrálních protilátek mohu způsobit dubiózní nebo slabě pozitivní výsledek.

Je-li test použit pro identifikaci perzistentně infikovaných zvířat starších 6 měsíců v populaci infikované pestiviry, jakýkoli vzorek vykazující dubiózní nebo negativní výsledek musí být považován za suspektní pro PI status.

- Tento test detekuje anti-p80/125 protilátky. Není určen pro ověřování účinnosti vakcinace inaktivovanými BVD/BD vakcínami.

**Metoda 2: ANALÝZA OPTICKÉ DENZITY**

**SKOT**

Vypočtěte „cut off“ hodnoty OD odpovídající 30% a 50% kompetici a porovnejte OD každého vzorku s „cut off“ OD CO 30 and OD CO 50.

 \_\_ \_\_

OD CO 30 = 0,70 OD N + 0,30 OD P

 \_\_ \_\_

OD CO 50 = 0,50 OD N + 0,50 OD P

**OVCE**

Vypočtěte „cut off“ hodnoty OD odpovídající 20% a 40% kompetici a porovnejte OD každého vzorku s „cut off“ OD CO 20 and OD CO 40 pro individuální vzorky; porovnejte OD každého vzorku s „cut off“ OD CO 40 pro směsné vzorky 3 sér.

 \_\_ \_\_

OD CO 20 = 0,80 OD N + 0,20 OD P

 \_\_ \_\_

OD CO 40 = 0,60 OD N + 0,40 OD P

**Interpretace výsledků:**

**SKOT**

 OD CO 50 OD CO 30

 | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Individuální vzorek | + | +/- | - |

 OD vzorku

**OVCE**

 OD CO 40 OD CO 20

 | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Individuální vzorek | + | +/- | - |
| Směsný vzorek | + | - |

 OD vzorku

**Technická podpora:**

Pokud chcete získat informace o tomto veterinárním diagnostickém přípravku, kontaktujte prosím držitele rozhodnutí o schválení:

Zoetis Česká republika s.r.o., náměstí 14. října 642/17, 150 00 Praha 5, Česká republika

Tel: +420 257 101 111

E-mail: infovet.cz@zoetis.com

POUZE PRO VETERINÁRNÍ ÚČELY/

POUZE PRO POUŽITÍ IN VITRO