**ID ScreenIBR gE competition**

**kompetitivní reakce**

Formát kompetitivní ELISA je určen k detekci protilátek gE k viru BHV-1

ve vzorcích hovězího séra, plasmy a mléka (vzorky individuální i směsné)

Pouze pro použití *in vitro*

**Výrobce: Distributor a držitel rozhodnutí o schválení:**





Innovative Diagnostics **O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.**

310, rue Louis Pasteur Bořetická 2668/1

Grabels – FRANCIE 193 00 Praha 9 Česká republika

E-mail: info@innovative-diagnostics.com E-mail: info@oks.cz

www.innovative-diagnostics.com www.biopro.cz

**Obecné informace**

• Kit založený na metodě kompetitivní ELISA je navržen k detekci protilátek typu gE k viru BHV-1.

• Kit může být použit pro vzorky kravského séra, plasmy a mléka (vzorky individuální,

i směsné).

• Kit identifikuje přirozeně infikovaná zvířata v očkované populaci.

**Popis a princip metody**

Jamky jsou pokryty přečištěným rekombinačním proteinem gE k viru BHV-1. Vzorky a kontroly se testují v jamkách mikrodestičky (96 jamek). Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky typu gE vytvoří komplex protilátka-antigen s epitopy gE proteinu. Do mikrodestičky se přidá konjugát značený křenovou peroxidázou (HRP). Ta následně fixuje protilátku k proteinu gE BHV-1 za tvorby antigen-protilátka-konjugát HRP. Po promytí je nadbytek konjugátu odstraněn pomocí roztoku substrátu (TMB).

Výsledné zbarvení závisí na množství přítomných specifických protilátek ve vzorku.

* V přítomnosti protilátek dojde k modrému zabarvení roztoku, které se po přidání stop roztoku změní na žluté.
* V nepřítomnosti protilátek se roztok nezabarví.

Mikrodestička je čtena při 450 nm.

**Obsah soupravy:**

|  |
| --- |
| **Reagencie:** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným rekombinantním proteinem gE viru BHV-1 |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 2 |
| Konjugát ready-to-use |
| Koncentrovaný promývací roztok (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Zastavovací roztok (0,5M) |
|  |

• Roztok konjugátu, kontroly a roztok substrátu musí být uloženy při teplotě 5 °C ± 3 °C.

• Ostatní reagencie mohou být uloženy při teplotě 2 °C–26 °C.

• Reagencie se stejným názvem u různých souprav výrobce ID.Vet jsou vzájemně zaměnitelné.

**Potřebný materiál, který není součástí soupravy:**

• Jedno nebo vícekanálová pipeta pro přenos 10 µl, 100 µl a 300 µl.

• Jednorázové špičky.

• Čtečka mikrodestiček pro 96jamkové destičky.

• Destilovaná nebo neionizovaná voda.

• Ruční nebo automatický promývací systém.

**Bezpečnostní opatření:**

1. Nepipetujte ústy.

2. Roztoky obsahují složky, které mohou být škodlivé pro pokožku i oči a při kontaktu mohou způsobit podráždění. Pracujte tak, aby nedocházelo ke kontaktu s pokožkou a očima. Používejte ochranný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Stop roztok (0,5 M) může být při požití škodlivý.

3. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.

4. Veškerý odpad by měl být před likvidací řádně dekontaminován. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů. Podrobnější informace naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání nebo na adrese: info@innovativediagnostics.com.

5. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

**Příprava vzorku**

Abyste předešli rozdílným inkubačním dobám u jednotlivých vzorků, připravte si 96 jamkovou destičku s testovanými a kontrolními vzorky. Poté přeneste testované vzorky a kontrolní roztoky do mikrotitrační destičky ELISA s využitím vícekanálové pipety.

**Příprava promývacího roztoku**

Pokud je to nutné, nechejte promývací koncentrovaný roztok (20x) po vyjmutí z chladničky pozvolna ohřát na pokojovou teplotu a důkladně promíchejte, aby se zajistilo, že promývací koncentrát je zcela homogenní. Připravte si pracovní promývací roztok (1x) zředěním koncentrovaného promývacího roztoku (20x) v destilované nebo deionizované vodě v poměru 1:20.

Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky. Dbejte na to, aby byly jamky mezi promývacími kroky zcela prázdné. Pokud používáte automatickou promývací stanici, zkontrolujte si správné nastavení funkčních parametrů promývací stanice (režim, typ aspirace, výška aspirace). Další informace naleznete v příručce "ID.Vet Washing Guide", která je k dispozici na vyžádání.

**Provedení testu**

Všechny následující reagencie nechejte pozvolna ohřát na pokojovou teplotu tj. 21 °C ± 5 °C před použitím kitu. Reagencie následně promíchejte pomalým převracením nebo kroužením.

*Vzorky sera a plasmy:*

1. Přidejte:

• 50 µl ředícího pufru 2 do každé jamky.

• 50 µl pozitivní kontroly do jamky A1 a B1

• 50 µl negativní kontroly do jamky C1 a D1.

• 50 µl vzorku do zbývajících jamek.

2. Mikrodestičku utěsněte a inkubujte přes noc tj. 16-20 hodin při teplotě 21 °C ± 5 °C.

 3. Prázdné jamky promyjte pětkrát přibližně 300 µl promývacího roztoku. Vyvarujte se vysušení jamek. Dbejte na to, aby v jamce nezůstával suchý kroužek ze zbytků mastných kyselin. Také se vyvarujte vzniku jakýchkoliv reziduí v jamkách.

4.

5.

*Mléko*:

1.

Přidejte 100 µl konjugátu do každé jamky.

Mikrodestičku zakryjte a inkubujte po dobu 30 minut ± 3 minuty při teplotě 21 °C ± 5°C.

Vzorky individuální i směsné:

Odstřeďte každý vzorek mléka a následně jej nechejte odstát, až se usadí laktosérum (spodní

vrstva). Pro potřeby testu pipetujte pouze laktosérum. Jsou zde přítomny protilátky.

2. Pro hromadné vzorky mléka

Poznámka: Pro hromadné vzorky mléka je optimální analytické citlivosti dosaženo při použití testu ID Screen IBR Milk Indirect ELISA. Nicméně při tomto testu není možné rozlišit protilátky vytvořené organismem při infekci a protilátkami vytvořené v reakci na očkování.

Při delší inkubaci, může dojít k chybným výsledkům. Po odstředění se pelety rozpouští ve 0,4 ml promývacího roztoku (1x).

Postup pro testování individuálního vzorku je následující:

1. Přidejte:

• 100 µl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

• 100 µl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

• 100 µl testovaného mléka do zbývajících jamek.

2. Utěsněte destičku a inkubujte 120 min ± 12 minut při teplotě 37 °C ± 3 °C po dobu 16-20 hodin.

3. Do prázdných jamek pipetujte 300 µl promývacího roztoku a 5krát promíchejte pomocí pipety. Dbejte na to, aby se dávkovaná kapalina nezavzdušnila. Při promývání vynechejte suché jamky. Pracujte tak, aby ve vzorku nezůstávaly žádné zbytky tuku. Pokud je to možné, nechejte destičku mezi promývacími cykly 2-5 minut odpočívat.

4. Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu.

5. Utěsněte destičku a inkubujte 30 minut ± 3 minuty při teplotě 37° ± 3°C.

*Pokračující protokol pro všechny typy vzorků:*

6. Prázdné jamky: Každou jamku promyjte třikrát objemem cca 300 µl promývacího roztoku. Pracujte tak, aby se jamky mezi jednotlivými promývacími cykly nevysušily.

7. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky.

8. Destičku utěsněte a inkubujte po dobu 15 minut ± 2 minuty při teplotě 21 °C ±5 °C v temnu.

9. Přidejte 100 µl stop roztoku do každé jamky, abyste zastavili reakci.

10. Výsledek se odečítá při vlnové délce 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:



Je střední hodnota negativní kontroly vyšší než 0,7.

Je poměr středních hodnotu pozitivní a negativní kontroly nižší než 0,3.

**Vyhodnocení:**



Pro každý vzorek vypočtěte hodnotu S/P dle následujícího výpočtu:

*Vyhodnocení výsledků – sérum, plasma:*

Vzorek s S/P:

* Menším nebo rovným 60 % je považován za pozitivní.
* Vyšším než 60 % je považován za negativní.

|  |  |
| --- | --- |
| **VÝSLEDEK** | **HODNOCENÍ** |
| **S/N ≤ 60 %** | **POZITVNÍ** |
| **S/N > 60 %** | **NEGATIVNÍ** |

*Vyhodnocení výsledků – mléko (individuální i směsné vzorky):*

Vzorky s S/P:

* Menším nebo rovným 60 % jsou považovány za pozitivní.
* Mezi 60 % a 70 % jsou považovány za hraniční.
* Větším nebo rovným 70 % jsou považovány za negativní.

|  |  |
| --- | --- |
| **VÝSLEDEK** | **HODNOCENÍ** |
| **S/N ≤ 60 %** | **POZITVNÍ** |
| **60 % < S/N < 70 %** | **HRANIČNÍ** |
| **S/N ≥ 70 %** | **NEGATIVNÍ** |

**Poznámka**: Software pro analýzu dat je volně dostupný na webových stránkách: support.software@id-vet.com.

Tento software vypočítává mnoho parametrů (kritéria platnosti, hodnoty S/P, titry, vakcinační

věk, skupiny) a nabízí grafický výstup dat serologických profilů testovaných zvířat.

**Dodatek – Kontakty**

**Výhradní distributor v ČR a SR a držitel rozhodnutí o schválení:**

**O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.**

**Kanceláře**: Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika

tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@oks.cz

**Servis**:

**Infolinka**:

Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika

tel.: +420 606 627 084, fax: +420 281 866 264, servis@oks.cz

+420 841 111 114

[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz/)

**O.K. SERVIS BioPro SK, s.r.o.**

**Kancelář:** Bulharská 70, 821 04 Bratislava, Slovenská republika

tel.: +421 243 634 967, fax: +421 233 331 785, bratislava@oks.cz

**Servis:** tel.: +421 911 799 727