



ID Screen® IBR gE kompetitivní

Kompetitivní ELISA pro stanovení anti-BHV-1 gE antigenů v hovězím séru, plasmě a mléce (jednotlivé vzorky, vzorky směsné nebo kondenzované vzorky).



Pro použití in vitro

IBRGEC ver 1012GB

Návod k použití

DŮLEŽITÉ:

- Výsledky se mohou lišit v závislosti na použité promývací metodě.
- Pro zlepšení robustnosti testu promyjte jamky 3x a mezi jednotlivá promytí začleňte cca 2 min odmáčecí dobu, po promytí následuje inkubace konjugátu.

Výrobce

ID.VET
innovative diagnostics

ID. VET

167 rue Medhi Ben Barka
Zone Garosud
34070 Montpellier
France
www.id-vet.com

Výhradní zástupce v ČR a SR

® O.K. SERVIS
BioPro
s.r.o.

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

Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9
Česká republika
info@oks.cz
www.biopro.cz

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

Bulharská 70, 821 04 Bratislava
Slovenská republika
bratislava@oks.cz
www.biopro.cz

Obsah

1. Obecné informace	3
2. Popis a princip	3
3. Obsah soupravy	3
4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	4
5. Upozornění	4
6. Příprava vzorku	4
7. Příprava promývacího roztoku	4
8. Pracovní postup.....	4
Dodatek – Kontakty	7

1. Obecné informace

Tento kit pro kompetitivní ELISu je navržen pro stanovení protilátek přímo proti gE glykoproteinu BHV-1 viru.

Je možné jej použít pro hovězí sérum, plasmu a mléko (jednotlivé vzorky, vzorky směsné nebo kondenzované vzorky).

Detekuje přirozeně infikovaná zvířata v očkované populaci za předpokladu, že jsou zvířata očkovaná vakcínami s odstraněným BHV-1 gE.

2. Popis a princip

Jamky jsou potaženy čištěným BHV-1 lyzátem.

Testované vzorky a kontroly se přidají do jamek. Anti-gE protilátky, pokud jsou přítomné, vytváří komplex antigen-protilátka, který maskuje gE epitopy.

Do jamek se přidá anti-gE křenový peroxidázový (HRP) konjugát. Ten naváže zbývající volné gE epitopy za tvorby komplexu antigen-konjugát-HRP.

Po eliminaci zbývajícího konjugátu promytím se přidá roztok substrátu (TMB).

Výsledné zbarvení závisí na množství specifických protilátek přítomných v testovaném vzorku:

- za nepřítomnosti protilátek se objeví modré zbarvení, které přejde po přidavku stop roztoku do žluté.
- za přítomnosti protilátek se neobjeví žádné zbarvení.

Mikrodestička se vyhodnocuje při 450 nm.

3. Obsah soupravy

Činidla*
Mikrodestičky potažené BHV-1 čištěným lyzátem
Anti gE-HRP (10x koncentrovaný konjugát)
Pozitivní kontrola
Negativní kontrola
Ředící pufr 1
Promývací koncentrát (20x)
Roztok substrátu (TMB)
Stop roztok (0,5 M H ₂ SO ₄)

*dodávaná množství jsou uvedena na štítku kitu

1. Konjugát, ředící pufr 1, kontroly a roztok substrátu musí být skladovány při 5 °C (± 3 °C).
2. Ostatní činidla je možné skladovat při teplotě mezi +2 °C až +26 °C.
3. Složky, které mají stejný název (promývací roztok, ředící roztoky) je možné použít pro celý sortiment IDvet.

4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy.

1. Jedno- nebo vícekanálové mikropipety o objemu 10 µl, 100 µl a 200 µl.
2. Jednorázové špičky.
3. Odečítačku mikrodestičky s 96 jamkami.
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
5. Manuální nebo automatické vymývací zařízení.

5. Upozornění

1. Nepipetujte ústy.
2. Roztok substrátu může dráždit kůži.
3. Stop roztok (0,5 M H₂SO₄) může způsobit vážné popáleniny (**R35**). V případě kontaktu s kůží nebo při zasažení očí ihned omyjte postižené místo velkým množstvím vody a vyhledejte lékaře (**S26**).
4. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.
5. Veškerý jednorázový materiál používaný ke zkoušce by měl být před likvidací nebo autoklávováním při 120 °C dekontaminován ponořením do čerstvě připraveného 5 % chlornanu sodného nejméně na 1 hodinu.

6. Příprava vzorku

Pro zabránění rozdílným v inkubační době mezi vzorky je možné připravit 96-jamkovou destičku obsahující testované vzorky a kontroly, než se přenesou vícekanálovou pipetou do ELISA mikrodestičky.

7. Příprava promývacího roztoku

Je nezbytné přenést promývací koncentrát (**20x**) do pokojové teploty a důkladně promíchat, aby se zajistilo úplné rozpuštění promývacího koncentráту (**20x**).

Připravte promývací roztok (**1x**) naředěním promývacího koncentráту (**20x**) v destilované / deionizované vodě v poměru 1:20.

8. Postup zkoušky

Před použitím ponechte všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Homogenizujte všechny reagenty převrácením nebo na vortexu.

Sérum a plazma

1. Přidejte:
 - do každé jamky 25 µl **ředícího pufru 1**.
 - do jamek A1 a B1 25 µl **pozitivní kontroly**.
 - do jamek C1 a D1 25 µl **negativní kontroly**.
 - do zbývajících jamek 25 µl každého vzorku.
2. Inkubujte **přes noc (12-16 hodin) při 21 °C (± 5 °C)**.

3. Vyprázdněte jamky. Každou jamku 3x promyjte přibližně 300 µl **promývacího roztoku**. Zabraňte vysušení jamek mezi promytími.

Jednotlivé vzorky a vzorky směsné:

Odstředte každý celý vzorek mléka nebo jen ponechte vzorky usadit, aby se oddělila smetana od laktoséra (smetana nahoře, laktosérum dole):

Pipetujte pod smetanou, aby se nepipetovalo jen laktosérum. (Protilátky se nacházejí v laktoséru.)

1. Přidejte:
 - do každé jamky 25 µl **ředícího pufru 1**.
 - do jamek A1 a B1 25 µl **pozitivní kontroly**.
 - do jamek C1 a D1 25 µl **negativní kontroly**.
 - do zbývajících jamek **150 µl** každého měřeného vzorku.
2. Inkubujte 2 hodiny ± 10 min při 37 °C (± 3 °C) nebo přes noc 12-16 hodin při 21 °C (± 5 °C).

Poznámka: IDvet doporučuje inkubaci přes noc, která nabízí lepší citlivost.

3. Vyprázdněte jamky. Každou jamku **5x** promyjte přibližně 300 µl **promývacího roztoku**. Zabraňte vysušení jamek mezi promytími. *Bud'te opatrní, aby po promytí nezůstal v jamce mastný kroužek. Aby se zabránilo tukovým usazeninám, je možné začlenit mezi promývání dobu pro odmočení 2-5 minut.*

Vzorky kondenzovaného mléka:

Je možné testovat kondenzované mléko. Sediment je třeba znovu vytvořit s 0,4 ml promývacího roztoku 1x a následně zcela rozředit. Vzorek je měřen jako vzorek směsný.

Pro všechny protokoly:

4. Připravte **konjugát 1x** naředěním **konjugátu 10x ředícím pufr** 1 v poměru **1:10**.
5. Do každé jamky přidejte 100 µl **konjugátu 1x**.
6. Inkubujte **30 min ± 3 min** při 21 °C (± 5 °C).
7. Jamky vyprázdněte. 3x promyjte každou jamku přibližně 300 µl **promývacího roztoku**. Zabraňte vysušení jamek mezi promytími. Pro zlepšení robustnosti testu promyjte jamky 3x a mezi jednotlivá promytí začleňte 2 min odmáčecí dobu.
8. Do každé jamky přidejte 100 µl **roztoku substrátu**.
9. Inkubujte **15 min ± 2 min** při 21 °C (± 5 °C) ve tmě.
10. Pro zastavení reakce přidejte do každé jamky 100 µl **stop roztoku**.
11. Vyhodnoťte a odečtěte O.D. při 450 nm.

JUJXUWY

V^••••• @ ç ~ hšŷ• dā^K
 Ä | { | } | Á @ á } [cā ^* aã } Ő [] d [| ^ Á Ü Ö } & DÄ Á ç z Ő ^ 0 Ä Ä
 Á
 ~~~~~U Ö} & NE Ä  
 Ä  
 Ä | { | } | Á @ á } [ cā [ : aã } Ő [ ] d [ | ^ Á Ü Ö } & DÄ Á ^ } z Ő ^ 0 Ä Ä Ä Ä Ä Á @ á } [ c Á Ü Ö } &  
 Á  
 ~~~~~U Ö} & Á Ü Ö} & Ä Ä Ä Ä

Vyhodnocení

U každého vzorku vypočtete kompetitivní procentuální podíl (S/N %):

$$\text{kompetitivní \%} = \frac{OD_{\text{vzorku}}}{OD_{\text{NC}}} \times 100$$

Pro sérum a plazmu

Vzorky:

- menší nebo rovny 40 % jsou považovány za pozitivní.
- větší než 40 % a menší než 50 % jsou považovány za nejisté.
- větší nebo rovny 50 % jsou považovány za negativní.

| výsledek | stav |
|---------------------|-----------|
| S/N % ≤ 40 % | POZITIVNÍ |
| 40 % < S/N % < 50 % | NEJISTÉ |
| S/N % ≥ 50 % | NEGATIVNÍ |

Pro jednotlivé vzorky mlék, vzorky směsné nebo kondenzované:

Vzorky:

- menší nebo rovny 60 % jsou považovány za pozitivní.
- větší než 60 % a menší než 70 % jsou považovány za nejisté.
- větší nebo rovny 70 % jsou považovány za negativní.

| výsledek | stav |
|---------------------|-----------|
| S/N % ≤ 60 % | POZITIVNÍ |
| 60 % < S/N % < 70 % | NEJISTÉ |
| S/N % ≥ 70 % | NEGATIVNÍ |

Dodatek – Kontakty

Výrobce



ID. VET

167 rue Medhi Ben Barka
Zone Garosud
34070 Montpellier
France
www.id-vet.com

Výhradní zástupce v ČR a SR



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

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

Infolinka: +420 841 111 114

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.: +421 220 512 703