**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava ELISA je určena k detekci protilátek proti viru infekční bronchitidy kuřat (IBV).

Jedná se o kvantitativní test pro detekci protilátek specifických pro IBV ve vzorcích kuřecího séra, plazmy nebo vaječného žloutku.

Použití u jiných druhů ptáků konzultujte s dodavatelem.

**Popis a princip**

Testovací mikrodestičky jsou potaženy vyčištěným rekombinantním proteinem IBV.

Vzorky a kontroly, které mají být otestovány, přidejte do jamek mikrodestičky. Jsou-li přítomny protilátky proti IBV, vytvoří komplex protilátka-antigen.

Do jamek mikrodestičky přidejte konjugát „anti-IBV-peroxidáza“ (HRP). Ten se naváže na protilátky přítomné ve vzorku za vzniku komplexu antigen-protilátka-konjugát-HRP.

Po vymytí přebytečného konjugátu přidejte roztok substrátu (TMB).

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

* v přítomnosti protilátek se objeví modré zbarvení, které se po přidání stop roztoku změní na žluté.
* v nepřítomnosti protilátek se neobjeví žádné zbarvení.

Mikrotitrační destička se odečítá při vlnové délce 450 nm.

**Součásti soupravy**

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným rekombinantním antigenem IBV |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Koncentrovaný konjugát (10x) |
| Ředící pufr 3 |
| Ředící pufr 14 |
| Promývací koncentrát (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

**\*** *Dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy.*

1. Konjugát, destičky, kontroly a roztok substrátu musí být skladován při teplotě 5 °C (± 3 °C).
2. Ostatní reagencie lze skladovat mezi +2 °C až +26 °C.
3. Podrobné podmínky skladování otevřených a/nebo neotevřených složek najdete na:

*www.innovative-diagnostics.com/storage-conditions*

1. Promývací a stop roztoky lze použít pro celou skupinu produktů ID.Vet. Substrátové roztoky a ředící pufry se stejnými čísly šarží je možné používat i mezi soupravami.

**Požadované materiály, které nejsou součástí balení**

1. Jedno nebo vícekanálové pipety pro 5 μl, 10 μl, 100 μl a 500 μl.
2. Jednorázové špičky.
3. 96 jamková mikrotitrační destička s předem naředěnými jamkami.
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
5. Manuální nebo automatický promývací systém.
6. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

**Bezpečnostní opat**ř**ení**

1. Nepipetujte ústy.

2. Obsahuje 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.

**P**ř**íprava promývacího roztoku**

Pokud je to nutné, nechejte před použitím ohřát koncentrovaný promývací roztok (20x) na pokojovou teplotu. Důkladně protřepejte, abyste zajistili, že promývající roztok bude homogenní. Promývací roztok (20x) nařeďte v poměru 1:20 v destilované / deionizované vodě. Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky.

Připravte si pracovní promývací roztok (1x) tak, že naředíte promývací koncentrát (20x) v poměru 1:20 v destilované nebo deionizované vodě.

Mezi promývacími kroky se ujistěte, že jsou jamky zcela prázdné. Používáte-li automatickou promývačku, je důležité správně nastavit parametry přístroje (režim, typ a výkon). Další informace naleznete v příručce "IDvet Washing Guide", která je k dispozici u dodavatele na vyžádání.

**Postup testování**

Pokud je to nutné, nechejte před použitím všechna činidla ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Homogenizujte všechna činidla obrácením nebo kroužením.

Negativní a pozitivní kontroly jsou v soupravách připravené k použití. NEPŘIDÁVEJTE ředící pufr do kontrolních jamek A1, B1, C1 a D1 – kontroly se testují neředěné.

Vzorky se naopak testují ředěné v poměru 1:500.

**Pro vzorky séra nebo plazmy (počáteční ředění 1:50, následované ředěním 1:10 v mikrodestičce ELISA):**

1. V ředící destičce vyhraďte jamky A1, B1, C1 a D1 pro kontroly a přidejte:

* 5 µl testovaného vzorku.
* 245 µl ředícího pufru 14 do všech jamek, do kterých byl přidán vzorek (kromě A1, B1, C1 a D1).

*Dodržování předepsaného pořadí (nejprve vzorky, poté ředící pufr) zajišťuje lepší reprodukovatelnost výsledků a umožňuje vizuálně kontrolovat přidávání vzorku (vzorků).*2. Do mikrodestičky ELISA poté přidejte:

* 100 µl negativní kontroly do jamek A1 a B1.
* 100 µl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.
* 90 µl ředícího pufru 14 do jamek, do kterých byl dříve přidán testovaný vzorek (NE do kontrolních jamek A1, B1, C1 a D1).
* 10 µl předem naředěného vzorku séra nebo plazmy připraveného výše uvedeným způsobem.

3. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **30 minut**

**± 3 minuty** při 21 °C (± 5 °C).

**Pro vzorky vaječného žloutku (počáteční ředění 1:5 a 1:50, následované ředěním 1:2 v mikrodestičce ELISA):**

**1. a)** Vzorky předem nařeďte následujícím způsobem:

- Smíchejte 80 µl promývacího roztoku (1x) s 20 µl vaječného žloutku.

- Před testování dobře promíchejte převracením nebo kroužením.

*Poznámka: Tyto zředěné vzorky vaječných žloutků mohou být skladovány při teplotě. -20 °C pro budoucí testování. Vzorky nesmí projít více než 3 cykly zmražení a rozmražení.*

**1. b)** V ředící destičce vyhraďte jamky A1, B1, C1 a D1 pro kontroly a přidejte:

* 5 µl testovaného vzorku.
* 245 µl ředícího pufru 14 do všech jamek, do kterých byl přidán vzorek (kromě A1, B1, C1 a D1).

*Dodržování předepsaného pořadí (nejprve vzorky, poté ředící pufr) zajišťuje lepší reprodukovatelnost výsledků a umožňuje vizuálně kontrolovat přidávání vzorku (vzorků).*

2. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

* 100 µl negativní kontroly do jamek A1 a B1.
* 100 µl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.
* 50 µl ředícího pufru 14 do všech jamek, do kterých byl dříve přidán vzorek (NE do kontrolních jamek A1, B1, C1 a D1).
* 50 µl předem naředěného vzorku vaječného žloutku připraveného výše uvedeným způsobem.

*Varování: Ujistěte se, že směs 50 + 50 µl je homogenní, aby nedošlo ke zvýšení signálu pozadí, což by mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům. V případě pochybností je možné směs připravit ve zkumavkách a důkladně promíchat kroužením. Takto připravené směsi přidejte 100 µl do destičky ELISA.*

3. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **30 minut ± 3 minuty** při 21 °C (± 5 °C).

**Pokračující postup pro všechny typy vzorků:**

4.Připravte si pracovní roztok konjugátu (1x) zředěním koncentrovaného roztoku konjugátu (10x) v poměru 1:10 v ředícím pufru 3.

5. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte nejméně 300 µl zředěného promývacího roztoku (1x). Nenechávejte jamky mezi promývacími kroky vysušit.

6. Do každé jamky přidejte 100 µl zředěného roztoku konjugátu (1x).

7. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **30 minut ± 3 minuty** při teplotě. 21 °C (± 5 °C).

8. Vyprázdněte jamky. Každou jamku 3x promyjte alespoň 300 µl promývacího roztoku (1x). Nenechávejte jamky mezi promývacími kroky vysušit.

9. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku substrátu.

10. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **15 minut ± 2 minuty** při teplotě 21 °C (± 5 °C) v temnu.

11. Do každé jamky přidejte 100 µl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 9, abyste zastavili reakci.

12. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu O.D. při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

* střední hodnota OD pozitivní kontroly (ODPC) je vyšší než 0,250.
* poměr středních hodnot pozitivní a negativní kontroly (ODPC a ODNC) je větší než 3.

**Vyhodnocení:**

Innovative Diagnostics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – FRANCIE

www.innovative-diagnostics.com - E-mail: info@innovative-diagnostics.com

Tel:+ 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95

Pro každý vzorek vypočítejte poměr S/P a titr protilátek. takto:

**Poměr S/P**

****

**Titr protilátek**

****

Hodnocení výsledků:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **S/P hodnota** | **ELISA Protilátka Titr** | **IBV Imunita stav** |
| S/P ≤ 0,2 | Titr ≤ 1625 | Negativní |
| S/P > 0,2 | Titr > 1625 | Pozitivní |

*Poznámka: Program pro analýzu dat IDSoft je k dispozici zdarma. Pro více informací prosím kontaktujte support.software@innovativediagnostics.com*

Tento softwarový program dokáže vypočítat mnoho parametrů (kritéria validace, hodnoty S/P nebo S/N, titry, vakcinační věk, skupiny) a nabízí grafické znázornění sérologických profilů testovaných zvířat.

**ID Screen IBV Indirect**

**2.0**

****

**Nepřímá ELISA pro detekci protilátek proti IBV**

**ve vzorcích kuřecího séra, plazmy nebo vaječného žloutku.**

**Pouze pro použití *in vitro***

**Pouze pro veterinární použití**

**192 testů, 480 testů, 960 testů**

**Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.**