cattletype BHV1 gE Ab Uživatelská příručka

K detekci protilátek proti glykoproteinu E bovinního herpesviru 1

 5 destiček (kat. č. CT270203)  20 destiček (kat. č. CT270205)

INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig, Germany



Obsah

[Obsah soupravy 3](#_Toc89334684)

[Účel použití 3](#_Toc89334685)

[Symboly 4](#_Toc89334686)

[Kontrola kvality 4](#_Toc89334687)

[Skladování 4](#_Toc89334688)

[Bezpečnostní informace 5](#_Toc89334689)

[Úvod 6](#_Toc89334690)

[Princip 6](#_Toc89334691)

[Vybavení a reagencie zajištěné uživatelem 7](#_Toc89334692)

[Důležitá upozornění 8](#_Toc89334693)

[Všeobecná opatření 8](#_Toc89334694)

[Protokol: ELISA testovací procedura 9](#_Toc89334695)

[Důležité body před spuštěním 9](#_Toc89334696)

[Co je třeba udělat před zahájením testu 9](#_Toc89334697)

[Příprava vzorků mléka 9](#_Toc89334698)

[Testování v případě séra a vzorků plazmy 10](#_Toc89334699)

[Testování v případě vzorků mléka 11](#_Toc89334700)

[Interpretace dat 12](#_Toc89334701)

[Validační kritéria 12](#_Toc89334702)

[Výpočet 12](#_Toc89334703)

[Interpretace výsledků 13](#_Toc89334704)

[Rychlý průvodce pro cattletype BHV1 gE Ab 15](#_Toc89334705)

# Obsah soupravy

cattletype BHV1 gE Ab Kat. č.

Počet destiček

Test. destička: mikrotitrační s 96 jamkami, potažená inaktivovaným BHV1 antigenem

5

20

(5) CT270203 5

(20) CT270205 20

Ředidlo vzorku, připraveno k použití 1 x 30 ml 1 x 125 ml

Negativní kontrola, připraveno k použití 1 x 3.5 ml 2 x 3.5 ml

Pozitivní kontrola, připraveno k použití 1 x 3.5 ml 2 x 3.5 ml

Promývací pufr, 10x koncentrovaný 3 x 125 ml 2 x 500 ml

Konjugát, připraveno k použití 1 x 60 ml 1 x 240 ml

TMB Substrát, připraveno k použití 1 x 60 ml 1 x 240 ml

Zastavovací roztok, připraveno k použití 1 x 60 ml 1 x 240 ml

Příručka 1 1

# Účel použití

Souprava *cattletype* BHV1 gE Ab je enzymová imunozkouška (ELISA). Slouží k detekci protilátek proti glykoproteinu E bovinního herpesviru 1 (BHV1) v séru, plazmě a vzorcích mléka skotu. Lze ji použít s jednotlivými vzorky nebo s poolovanými vzorky mléka následně po přípravě vzorků pomocí kitu *cattletype* Milk Prep Kit. Souprava je schválena institutem Friedrich-Loeffler-Institut a registrována v souladu s § 17c německého Zákona o zvířecích nemocech (FLI-B 664) k použití pro veterinární diagnostické procedury v Německu.

Pouze k veterinárním účelům.

# Symboly

Zákonný výrobce

  Číslo šarže

  Datum spotřeby

 Teplotní omezení při skladování

  Příručka

 Katalogové číslo

Číslo materiálu

Pro vzorky skotu

# Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti ISO certifikovaným společností ISO je každá dávka bovinného typu BHV1 gE Ab testována na základě předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

# Skladování

Komponenty soupravy *cattletype* BHV1 gE Ab ELISA je třeba skladovat při teplotě 2–8 °C a zůstávají stabilní do data spotřeby uvedeného na štítku.

Promývací pufr (10x) a zastavovací roztok lze skladovat při pokojové teplotě (18–25 °C), aby nedocházelo ke krystalizaci soli. Pokud jsou součástí soupravy testovací stripy, zbylé testovací stripy skladujte do dalšího použití v těsně uzavřeném fóliovém váčku se sikativem při teplotě 2–8 °C. Testovací stripy lze skladovat po dobu nejméně 6 týdnů po otevření sáčku s destičkou.

# Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Tyto informace získáte od místního obchodního zástupce nebo e-mailem na adrese compliance@indical.com.

UPOZORNĚNÍ: Zastavovací roztok obsahuje 0,5M kyselinu sírovou.

Všechny zbytky vzorků a předměty, které se dostaly do kontaktu se vzorky, je nutné dekontaminovat nebo zlikvidovat jako potenciálně infekční materiál.

# Úvod

Cattletype BHV1 gE Ab je citlivým testem pro detekci protilátek proti glykoproteinu E (gE) hovězího herpesviru 1 (BHV1) v séru, plazmě a mléčných vzorcích. BHV1 je příčinou infekční bovinní rinotracheitidy (IBR) - respiračního onemocnění, které způsobuje tracheitidu, rinitidu a horečku. Kromě toho infekce BHV1 může způsobit infekční pustulární vulvovaginitidu (IPV), balanoposthitidu a potraty.

Klinické onemocnění je často následováno latentní infekcí BHV1. Reaktivace viru může způsobit šíření infekce ve stádu.

Standardní sérologické metody nemohou rozlišovat mezi přirozeně infikovanými a očkovanými zvířaty s výjimkou IBR vakcín, které neobsahují gE virový protein, a proto umožňují sérologickou diferenciaci. cattletype BHV1 gE Ab specificky detekuje protilátky proti gE a nereaguje s protilátkami z vakcín s deletovanou gE.

Proto tato metoda identifikuje zvířata, která byla infikována kmeny BHV1 nebo očkována vakcínami IBR s nedeletovanou gE.

# Princip

*cattletype* BHV1 gE Ab je blokovací ELISA. Testovací destička je potažena inaktivovaným antigenem BHV1. Během inkubace vzorku se BHV1-specifické protilátky vážou na imobilizovaný antigen. Nevázaný materiál se odstraňuje promýváním.

Test *cattletype* BHV1 gE Ab je ELISA test. Testovací destička je potažena inaktivovaným antigenem BHV1. Během inkubace vzorku se BHV1-specifické protilátky váží na imobilizovaný antigen. Nevázaný materiál se odstraní promytím. Přidá se HRP-značená, gE-specifická monoklonální protilátka, která se nemůže na BHV1 antigen vázat, protože je její antigen předtím obsazen protilátkami v testovacím vzorku. Nevázaný anti-gE-HRP konjugát je vymyt. Přidáním substrátového roztoku se odstartuje barevná reakce, která se po 10 minutách zastaví. Spektrofotometrem se změří optická hustota (OD). Vypočítá se blokovací hodnota (procento inhibice) z OD hodnot získaných s testovacím vzorkem a negativní kontrolou, která neobsahuje žádné BHV1-specifické protilátky.

# Vybavení a reagencie zajištěné uživatelem

Při práci s chemikáliemi mějte vždy oblečený vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Více informací se dočtete v příslušných BL, které jsou k dispozici u dodavatele produktu.

 Kádinky

 Odměrné válce

 Pipety (nastavitelné)

 Multikanálové pipety (nastavitelné)

 Hliníková nebo lepicí fólie k přikrytí testovací destičky

 Volitelné: Zařízení pro aplikaci a nasátí promývacího pufru

 Čtečka absorbance mikrotitrační destičky

 Destilovaná voda

# Důležitá upozornění

## Všeobecná opatření

Uživatel by měl vždy dbát následujících pokynů:

 Při provádění testu nevystavujte TMB substrátový roztok intenzivnímu světlu ani slunečnímu světlu.

 Nesmí dojít ke kontaminaci komponentů testovací soupravy ani k jejich smíchání s komponenty z jiných šarží.

 Komponenty testovací soupravy nepoužívejte, pokud již uplynulo datum spotřeby.

 Nedostatečně čistá voda ze systémů s iontovou výměnou použitá k ředění promývacího pufru (10x) může test narušit. Použijte dvojitě destilovanou vodu nebo vysoce purifikovanou vodu (např. Milli-Q).

 Aby byla výsledky testu přesné, je nezbytné při provádění testu použít čisté nádobí a při pipetování a výplachu postupovat opatrně a striktně dodržovat inkubační doby.

# Protokol: ELISA testovací procedura

## Důležité body před spuštěním

* Prosím přečtěte si „Důležité poznámky“ na straně 8 před spuštěním.

## Co je třeba udělat před zahájením testu

 Bezprostředně před použitím vytemperujte reagencie na pokojovou teplotu (18–25 °C). V případě, že se v promývacím pufru (10x) vyskytnou precipitované krystaly soli, rozpusťte je jemným vířením a zahříváním.

 Nařeďte promývací pufr (10x) 1:10 v destilované vodě. Například pro jednu testovací destičku nařeďte 50 ml promývacího pufru (10x) ve 450 ml destilované vody a promíchejte.

 Lze použít čerstvé, chlazené nebo předtím zmrazené sérum nebo vzorky plazmy.

## Příprava vzorků mléka

Před analýzou vzorků je nutné vzorky mléka zbavit tuku. Vzorky plnotučného mléka odstřeďujte 10 minut při 3000 x g a 10 °C nebo vzorky uchovejte přes noc v chladnu při teplotě 2-8 °C. Nyní odstraňte oddělený tuk.

## Testování v případě séra a vzorků plazmy

Přečtěte si „Co je třeba udělat před zahájením testu“, strana 9.

Postup

1. Napipetujte 50 μl připraveného ředidla vzorku do jamek testovací destičky.

2. Napipetujte 50 μl negativní kontroly (duplikátně) a pozitivní kontroly (duplikátně) do příslušných jamek a zamíchejte.

3. Napipetujte 50 μl vzorků do zbývajících jamek a zamíchejte. Upozornění: Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků do testového protokolu. Zamíchejte buďto na destičkové třepačce nebo opakovaným nasátím a vypuštěním tekutiny. Testovací destičku přikryjte.

4. Inkubujte přes noc (16–22 h) při pokojové teplotě (18–25 °C).

5. Odstraňte roztok z jamek odsátím a vyklepáním.

6. Každou jamku promyjte 5x 300 μl připraveného promývacího pufru. Po každém promytí odstraňte pufr odsátím a vyklepáním.

7. Do každé jamky napipetujte 100 μl připraveného konjugátu a inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).

8. Odstraňte roztok z jamek nasátím a vyklepáním.

9. Každou jamku promyjte 5x 300 μl připraveného promývacího pufru. Po každém promytí odstraňte pufr odsátím a vyklepáním.

10. Do každé jamky napipetujte 100 μl TMB substrátového roztoku.

11. Inkubujte v temnu 10 min při pokojové teplotě. Po naplnění první jamky spusťte časování.

12. Zastavte reakci přidáním 100 μl zastavovacího roztoku na každou jamku. Přidejte zastavovací roztok ve stejném pořadí, jako jste přidávali substrátový roztok.

13. Změřte OD ve čtečce destiček při 450 nm do 20 min po zastavení reakce.

Měření při referenční vlnové délce (620–650 nm) je volitelné.

## Testování v případě vzorků mléka

Přečtěte si „Co je třeba udělat před zahájením testu“, strana 9.

Postup

1. Napipetujte 100 μl negativní kontroly (duplikátně) a pozitivní kontroly (duplikátně) do příslušných jamek.

2. Napipetujte 100 μl odtučněného mléka do zbývajících jamek. Upozornění: Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků do testového protokolu. Testovací destičku přikryjte.

3. Inkubujte přes noc (16–18 h) při pokojové teplotě (18–25 °C).

4. Odstraňte roztok z jamek odsátím a vyklepáním.

5. Každou jamku promyjte 5x 300 μl připraveného promývacího pufru. Po každém promytí odstraňte pufr vysátím a vyklepáním.

6. Do každé jamky napipetujte 100 μl připraveného konjugátu a inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).

7. Odstraňte roztok z jamek odsátím a vyklepáním.

8. Každou jamku promyjte 5x 300 μl připraveného promývacího pufru. Po každém promytí odstraňte pufr odsátím a vyklepáním.

9. Do každé jamky napipetujte 100 μl TMB substrátového roztoku.

10. Inkubujte v temnu 10 min při pokojové teplotě. Po naplnění první jamky spusťte časování.

11. Zastavte reakci přidáním 100 μl zastavovacího roztoku na každou jamku. Přidejte zastavovací roztok ve stejném pořadí, jako jste přidávali substrátový roztok.

12. Změřte OD ve čtečce destiček při 450 nm do 20 min po zastavení reakce.

Měření při referenční vlnové délce (620–650 nm) je volitelné.

# Interpretace dat

## Validační kritéria

Výsledky jsou platné, pokud jsou splněna následující kritéria:

* Střední hodnota (MV) naměřených hodnot OD pro negativní kontrolní sérum musí být ≥ 0,50.
* Blokovací hodnota vypočítaná ze střední hodnoty MV naměřené hodnoty OD pro pozitivní kontrolu (PC) musí být ≥ 75 %.

Jsou-li validační kritéria neplatná, je nutné test po důkladném přečtení návodu na použití zopakovat.

## Výpočet

Vypočítejte střední hodnoty (MV) naměřené OD pro negativní kontrolní sérum (NC) a pozitivní kontrolní sérum (PC).

Výpočet pro sérum a plazmu:

Blokovací hodnota se vypočítá podle následujícího vzorce:

% blocking =

MV ODNC – ODsample

x 100

MV ODNC

Výpočet pro mléko:

Blokovací hodnota se vypočítá podle následujícího vzorce:

% blocking =

(MV ODNC\*2) – ODsample (MV ODNC\*2)

x 100

# Interpretace výsledků

Interpretace dat pro sérum a vzorky plazmy

* Vzorky s blokovacími hodnotami < 40 % jsou negativní.

Specifické protilátky proti BHV1 nebyly detekovány.



* Vzorky s blokovacími hodnotami ≥ 40 % a < 50 % jsou hraniční. Doporučujeme zvířata s hraničními výsledky otestovat znova.



* Vzorky s blokovacími hodnotami ≥ 50 % jsou pozitivní.

Specifické protilátky proti BHV1 byly detekovány.

Interpretace dat pro vzorky mléka

* Vzorky s blokovací hodnotou < 35% jsou negativní.

Specifické protilátky BHV1 gE nebyly detekovány.

* Vzorky s blokovací hodnotou ≥ 35% jsou pozitivní.

Specifické protilátky BHV1 gE byly detekovány.

Poznámka: v případě negativního výsledku z jednotlivých vzorků mléka se doporučuje přetestovat sérum nebo plasmu těchto zvířat k potvrzení individuálního BHV-1 stavu. Citlivost testovaného poolovaného mléka lze zvýšit použitím vhodného protokolu pro zakoncentrování imunoglobulinů v mléku.

INDICAL nabízí řadu souprav ELISA a real-time PCR a real-time RT-PCR souprav pro detekci živočišných patogenů. Navštivte www.indical.com, kde naleznete další informace o produktech baktotyp, cador, cattletype, flocktype, pigtype a virotype.

Aktualizované informace o licencích a odmítnutí odpovědnosti za konkrétní produkt naleznete v příslušné příručce k soupravě INDICAL nebo uživatelské příručce.

Poznámky

Index změn

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Příručka | Verze | Změna |
| HB-1833-007 | Květen 2018 | INDICAL design |

# Rychlý průvodce pro cattletype BHV1 gE Ab

Ředění vzorků:

Sérum, plazma 1:2, dobře promíchejte Neředěné mléko

Krok Protokol

1. Vzorek

100 µl/jamka

2. Inkubace Přes noc (16-22 h) při pokojové teplotě (RT)

3. Promývání

5 x 300 µl

4. Konjugát 100 µl/ jamka

5. Inkubace

30 min při pokojové teplotě

6. Promytí 5 x 300 µl

7. TMB

100 µl/jamka

8. Inkubace 10 min při pokojové teplotě

9. Zastavení

100 µl/jamka

10. Odečtení 450 nm

Interpretace dat

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Negativní | Hraniční | Pozitivní |
| Sérum, plazma | < 40% | ≥ 40% and < 50% | ≥ 50% |
| Mléko | < 35% | - | ≥ 35% |

Objednávky: [www.indical.com/contact](http://www.indical.com/contact) Technická podpora: support@indical.com Web: [www.indical.com](http://www.indical.com/)