

# INGEZIM IBR COMPAC 2.0

12.BHV.K3

Imunoenzymatický test (blokovaná ELISA) pro stanovení specifických protilátek glykoproteinu gB viru infekční bovinní rhinotracheitdy (BoHV), v bovinním mléku a séru.

POUZE PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ IN VITRO!

12.BHV.K3 Poslední revize: 01-06-18

|  |  |
| --- | --- |
| **VÝROBCE:** | **DODAVATEL V ČR:** |
| **INGENASA**  C/Hnos. García Noblejas, 41  28037 – MADRID (Spain)  Tel: +34 91368.05.01/04  Fax: +34 91 408.75.98  Email: marketing@ingenasa.es | **NOACK ČR spol. s r.o.**  Pacajevova 32  149 00 Praha 4  Tel: 267 913 675  Fax: 272 910 092  diagnostika@noackgroup.com |

### OBSAH SOUPRAVY

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Reagencie** | | **Obsah v soupravě** | | | | | | |
| **2 destičky stripů** | | | | **5 destiček stripů** | | |
| **Počet** | | **Objem** | | **Počet** | | **Objem** |
| 96 jamková mikrotitrační destička (12 stripů po 8 jamkách). | 2 | | - | | 5 | | - | |
| Lahvičky s pozitivní kontrolou. | 1 | | 600 µl | | 2 | | 600 µl | |
| Lahvičky s negativní kontrolou. | 1 | | 600 µl | | 2 | | 600 µl | |
| Lahvičky s konjugátem 100x koncentrovaným (MAb konjugovaná peroxidázou) | 1 | | 300 µl | | 2 | | 300 µl | |
| Lahvičky s promývacím roztokem 25x koncentrovaným. | 1 | | 125 ml | | 1 | | 125 ml | |
| Lahvičky s ředícím roztokem DE01-01 | 1 | | 125 ml | | 1 | | 125 ml | |
| Lahvičky se substrátem (TMB).  (přímo k použití) | 1 | | 30 ml | | 1 | | 60 ml | |
| Lahvičky se STOP činidlem. | 1 | | 65 ml | | 1 | | 65 ml | |

***Další materiál a reagencie nedodávané v soupravě:*** destilovaná nebo deionizovaná voda, mikropipety (5–200 µl), jednorázové pipetovací špičky, promývačka mikrotitračních jamek, zkumavky (50–250 ml), ELISA reader (s filtrem 450 nm).

I. – TECHNICKÝ ZÁKLAD:

Souprava je navržena pro snadnou detekci specifických protilátek proti BHV-1 v bovinním séru a mléce.

Stanovení je založeno na blokované enzymatické imunoanalýze (Blocking ELISA). Stručný popis techniky je popsán níže:

Antigen je vázaný na pevnou podložku (polystyrenová destička). Vzorky séra se napipetují do jednotlivých jamek. Po inkubaci destičky se vzorky séra se přidá specifická monoklonální protilátka (MAb konjugovaná peroxidázou). Tato MAb je specifická pro gB protein BHV-1.

Jestliže vzorek obsahuje protilátky specifické k viru, nedojde k navázání značené MAb na antigen. A naopak, jestliže neobsahuje specifické protilátky, MAb se naváže na antigen vázaný na destičce.

Po promytí destičky se přítomnost nebo absence značené MAb projeví po přidání substrátu, kdy v přítomnosti peroxidázy dochází ke kolorimetrické reakci.

Díky vysoké specificitě MAb použité jako konjugát je vyšetření vysoce specifické a citlivé.

### II. – UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ PRO UŽIVATELE:

1. Pečlivě si přečtěte návod k použití.
2. Před použitím vytemperujte reagencie na pokojovou teplotu (20-25 °C).
3. Nekombinujte návody a reagencie z různých souprav.
4. Zabraňte kontaminaci reagencií.
5. Nepoužívejte reagencie po exspiraci a nekombinujte reagencie různých šarží.
6. Při práci nejezte, nepijte, nekuřte.
7. Nepipetujte ústy.
8. Pro každý vzorek séra použijte novou pipetovací špičku.
9. S každou sérií vzorků proveďte pozitivní a negativní kontrolu.

10.STOP činidlo je silná kyselina, musí s ním být zacházeno opatrně. Při kontaktu s pokožkou opatrně omývejte postižené místo čistou vodou.

11.Se substrátem a substrátovým pufrem zacházejte opatrně, jsou citlivé na světlo a kontaminaci

### III. – SKLADOVÁNÍ:

Všechny reagencie skladujte při teplotě +2 až +8 °C.

Otevřené lahvičky kontrolního séra jsou stabilní jeden měsíc při teplotě +2 až +8 °C, pokud nebudou během této doby použity, doporučujeme skladovaní při teplotě -20 °C.

### IV. – INFORMACE K PROMÝVÁNÍ:

Promývání lze provádět pomocí automatické promývačky nebo vícekanálové pipety, která umožňuje dávkovat 300 µl do každé jamky.

Po inkubaci proveďte promytí dle následujícího postupu:

* Vylijte obsah destičky rychlým otočením, aby nedošlo k promíchání obsahu mezi jamkami.
* Rozdělte 300 µl promývacího roztoku do každé jamky.
* Opatrně zatřepte destičkou, pozor, aby nedošlo ke kontaminaci mezi jamkami.
* Rychlým otočením destičky jamky vyprázdněte.
* Postup opakujte tolikrát, jak je uvedeno v návodu.
* Před posledním opakování promývání se ujistěte, že máte připravenou další reagencii. Nenechávejte destičku suchou déle, než je nezbytně nutné.
* Po posledním opakování promývání destičku oklepejte o savý filtrační papír.

### V. – PŘÍPRAVA VZORKŮ:

Sérum:

Vzorky séra nařeďte 1/2 pomocí ředícího roztoku dodávaného v soupravě (DE01-01). Tento krok lze provést přímo v jamkách destičky přidáním 50 µl ředícího roztoku a 50 µl vzorku séra, pořádně promíchejte.

Mléko (individuální vzorky nebo tankové):

Mléko se musí testovat neředěné. Testované mléko může být čerstvé, chlazené nebo rozmrazené. Pro eliminaci interference lipidů je vhodné mléko odstředit (15 minut při 2000 xg) nebo zanechat přes noc při 4 °C (na povrchu se vytvoří vrstva lipidů). Pro vlastní vyšetření odebíráme vzorek pod touto lipidovou vrstvou. Pro získání syrovátky zmrazte/rozmrazte vzorek mléka.

**VI. – PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:**

* ***Promývací roztok:***

Smíchejte 1 díl promývacího koncentrátu s 24 díly destilované nebo deionizované vody (40 ml koncentrátu a 960 ml vody). Takto připravený roztok je stabilní při teplotě skladování +2 až +8 °C.

* ***Příprava konjugátu (příprava těsně před použitím!):***

Požadovaný objem konjugátu zřeďte 1/100 (ředící roztok je součástí soupravy). Pro kompletní destičku je potřebný objem konjugátu 110 µl + 11 ml ředícího roztoku. Pro 8 jamek je potřebný objem 10 µl konjugátu+ 1 ml ředícího roztoku. Takto připravený konjugát před použitím protřepejte.

Vždy připravujte pouze potřebné množství konjugátu pro vlastní vyšetření. Nespotřebovaný roztok se musí vyhodit.

* ***Příprava kontrol:***

Kontroly se ředí ½ ředícím roztokem DE01-1, pro vzorky séra a 1/5 v případě vzorků mléka.

POZOR: Otevřené lahvičky kontrolního séra jsou stabilní jeden měsíc při teplotě +2 až +8 °C, pokud nebudou během této doby použity, doporučujeme skladovaní při teplotě -20 °C.

### VII. – POSTUP

Před vlastní testem ohřejte všechny reagencie (kromě konjugátu) na laboratorní teplotu 20–25 °C.

1. Napipetujte vzorky (séra nebo mléko)

Napipetujte 100 µl vzorku do příslušných jamek (příprava vzorků je popsána v sekci V.) Na závěr napipetujte pozitivní a negativní kontroly do odpovídajících jamek (příprava kontrol je popsána v sekci VI.). Doporučuje se zatavení destičky. **V případě vzorků séra inkubujte 1 hodinu při 37 °C, v případě vzorků mléka 16–20 hodin při laboratorní teplotě ve vlhkostní komoře.**

1. Konjugát nechte vytemperovat na pokojovou teplotu (20–25 °C).
2. Promyjte 5x dle uvedeného postupu.
3. Přidejte 100 µl konjugátu do každé jamky (připraveného podle výše uvedeného postupu). Destičkou mírně zatřepejte pro účel správného promíchání jednotlivých reagencií. Zakryjte destičku a **inkubujte 30 minut při pokojové teplotě** (20–25 °C).
4. Promyjte 5x dle uvedeného postupu.
5. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky pomocí vícekanálové pipety. **Inkubujte destičku 15 minut při pokojové teplotě na temném místě.**
6. Přidejte 100 µl STOP činidla do každé jamky.
7. Odečtěte OD každé jamky pomocí spektrofotometru při 450 nm. Nejpozději do 5 minut od přidání STOP činidla

### VIII. – ODEČET A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ:

Odečet OD proveďte pomocí spektrofotometru při 450 nm.

A) OVĚŘENÍ TESTU:

Test je platný jestliže:

Hodnota OD negativní kontroly je vyšší než 0,750

Poměr OD pozitivní kontroly / OD negativní kontroly musí být nižší než 0,3

B) INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud jsou vzorky vyšetřovány v duplikátech, je třeba stanovit aritmetický průměr OD pro daný vzorek.

Stanovte procento blokace (% Blocking) pro každý vzorek:

**Abs negativní kontroly – Abs vzorku**

**% Blocking = ------------------------------------------------------------------- x 100**

**Abs negativní kontroly – Abs pozitivní kontroly**

Sérum:

* Vzorky s hodnotou % blokace nižší než 25 % jsou považovány za **negativní**.
* Vzorky s hodnotou % blokace vyšší než 30 % jsou považovány za **pozitivní**.
* Vzorky s hodnotou % blokace mezi 25 % a 30 % jsou nejisté. Dotyčná zvířata je doporučeno znovu otestovat po 3 týdnech.

Mléko:

* Vzorky s hodnotou % blokace nižší než 40 % jsou považovány za **negativní**.
* Vzorky s hodnotou % blokace vyšší nebo stejnou než 40 % jsou považovány za **pozitivní**.