**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava je určena k detekci protilátek proti *Brucella abortus* (u skotu), *Brucella melitensis* (u ovcí a koz) a *Brucella suis* (u prasat). Lze ji použít pro vzorky krevního séra nebo plazmy skotu, ovcí, koz a prasat testovaných individuálně nebo v případě skotu i pro směsné vzorky. V případě směsných vzorků je možné testovat až 10 vzorků v 1 souboru.

**Popis a princip**

Jamky v mikrodestičce ELISA jsou potaženy přečištěným antigenem LPS *Brucella abortus*.

Testované vzorky a kontroly se přidají do jamek mikrodestičky ELISA zředěné v poměru 1/20. Pokud jsou v testovaném vzorku přítomny protilátky Anti-Brucella, vytvoří komplex protilátka-antigen. V dalším kroku se do jamek mikrodestičky ELISA přidává konjugát označený křenovou peroxidázou (HRP), který se váže na komplex protilátka-antigen za vzniku konjugovaného komplexu protilátka-antigen-konjugát-HRP.

Po vymytí přebytečného konjugátu se přidá 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 540 nm.

**Součásti soupravy**

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným antigenem *Brucella* LPS |
| Koncentrovaný roztok konjugátu (10x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 2 |
| Ředící pufr 3 |
| Promývací koncentrovaný roztok (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

*\*Dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy*

1.Roztok konjugátu, kontroly a roztok substrátu musí být skladovány při teplotě 5 °C (± 3 °C).

2. Ostatní činidla lze skladovat při teplotě +2 °C

 až +26 °C.

3. Podrobné informace o podmínkách skladování otevřených a/nebo neotevřených součástí soupravy naleznete na:

 https://www.id- vet.com/fr/support/faq

4. Promývací a stop roztoky lze použít pro celou řadu výrobků ID.Vet. Roztoky substrátu a ředící pufry se stejnými čísly šarží jsou zaměnitelné.

**Požadované materiály, které nejsou součástí balení**

1. Jedno nebo vícekanálové pipety

pro dávkování 10 μl, 100 μl a 500 μl.

1. Jednorázové špičky.
2. 96 jamková mikrotitrační destička s předem naředěnými jamkami.
3. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
4. Manuální nebo automatický promývací systém.
5. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

**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 "IDvet Washing Guide", která je k dispozici na vyžádání.

**Postup testování**

Pokud je to nutné, nechejte všechna činidla po vyjmutí z chladničky ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Všechna činidla důkladně promíchejte pomalým převracením nebo kroužením.

1. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 190 μl ředícího pufru 2 do všech jamek.

- 10 μl negativní kontroly do jamek A1 a B1.

- 10 μl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

- 10 μl testovaného vzorku nebo testované skupiny vzorků do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut**\*** (± 4 minuty) při teplotě do 21 °C (± 5 °C).

***\* Pouze pro jednotlivé vzorky séra je také možné inkubovat přes noc v rozmezí 16 až 20 hodin při teplotě 21 °C (± 5 °C).***

3. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte nejméně 300 μl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

4. Připravte si pracovní roztok konjugátu (1x) naředěním koncentrovaného roztoku konjugátu (10x) v poměru 1:10 (pro protokol s krátkou inkubací) nebo v poměru 1:20 (pro protokol s inkubací přes noc) v ředícím pufru 3.

5. Do každé jamky přidejte 100 μl naředěného roztoku konjugátu (1x).

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

7. Jamky vyprázdněte. Každou jamku 3x promyjte nejméně 300 μl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

8. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku substrátu.

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

10. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 8, aby se zastavila reakce.

11. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

* průměrná hodnota OD pozitivní kontroly (ODPC) je vyšší než 0,350.



* poměr středních hodnot pozitivní a negativní kontroly (ODPC a ODNC) je větší než 3.

**Vyhodnocení:**

Pro každý vzorek vypočítejte hodnotu S/N podle následujícího vzorce:



**Pro jednotlivé vzorky séra nebo plazmy,**

**s protokolem rychlé inkubace**

**nebo inkubace přes noc:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/P ≤ 110 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **110% < S/P ≤ 120 %** | **HRANIČNÍ** |
| **S/P > 120 %** | **POZITIVNÍ** |

**Pro směsné vzorky séra nebo plazmy:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/P ≤ 20 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **S/P > 20 %** | **POZITIVNÍ** |

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

**Poznámka**:

K dispozici je program pro analýzu dat IDSoft zdarma. Pro více informací se obraťte na email oddělení technické podpory: support.software@innovative-diagnostics.com

Tento program vypočítává mnoho parametrů (kritéria platnosti, hodnoty S/P, titry nebo věk), dále nabízí grafické znázornění a sérologické profily testovaných zvířat.



**ID Screen**

**Brucellosis Serum Indirect**

**Multi-species**



**Vzorky séra nebo plazmy**

**Protokol s krátkou inkubací**

**nebo protokol s inkubací přes noc**

Pouze pro použití *in vitro*

Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.

**192 testů, 480 testů, 960 testů**

**Nepřímá ELISA pro detekci protilátek proti *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* a *Brucella suis* v séru nebo plazmě pro jednotlivé i směsné vzorky u skotu a ostatních vnímavých zvířat**