**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava je určena pro detekci specifických protilátek proti proteinu p80-125 známého jako NSP2-3 viru bovinní virové diarey (Bovine viral diarrhoea/Mucosal Disease/Border Disease) pomocí metody ELISA založené na principu kompetice.

Tento test lze použít s hovězím sérem nebo plazmou (jednotlivé nebo směsné vzorky až do 10 vzorků) nebo mlékem (jednotlivé nebo hromadné vzorky) pro diagnostiku virové diarey skotu (BVD) a/nebo slizničního onemocnění (MD). Tento test lze také použít pro vzorky séra nebo plazmy malých přežvýkavců (jednotlivé vzorky nebo směsné vzorky o maximálním počtu 5 vzorků) pro diagnostiku hraniční choroby (BD).

Tento dokument popisuje návod k použití pro vzorky séra nebo plazmy. Při zpracování vzorků mléka nahlédněte do protokolu pro vzorky mléka (Protokol 2/2).

**Popis a princip**

Mikrodestičky jsou potaženy přečištěným antigenem p80 izolovaným z viru BVD. Vzorky, které mají být testovány a kontroly se přidají do jamek mikrotitrační destičky. Protilátky proti antigenu p80, pokud jsou ve vzorku přítomny, vytvoří komplex antigen-protilátka. V dalším kroku se do jamek přidá konjugát anti-p80 označený křenovou peroxidázou (HRP). Tento konjugát se naváže na komplex antigen-protilátka, čímž vytvoří konjugovaný komplex antigen-protilátka-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 p80-125 |
| Konjugát připravený k použití (1x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 19 |
| Promývací roztok (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

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

1. Konjugát, 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.
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 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 séra nebo plazmy**

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.

**Individuální vzorky séra nebo plazmy:**

**Protokol s krátkou inkubací**

1. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 90 μl ředícího pufru 19 do každé jamky.

- 10 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 10 μl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 10 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 5 minut při 37 °C (± 3 °C).

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

**Protokol s inkubací přes noc**

1. Vzorky se testují zředěné v poměru 1:50 následujícím postupem:

a) Do mikrodestičky pro ředění roztoků přidejte:

- 5 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 5 μl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 5 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

- 245 μl ředícího pufru 19 do každé jamky.

b) Do mikrotitrační destičky ELISA přeneste:

- 100 μl předem naředěné pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 100 μl předem naředěné negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 100 μl předem naředěného vzorku, který má být testován do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte přes noc (16-20 hodin) při teplotě 5 °C (±3 °C).

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

**Směsné vzorky séra nebo plazmy (až 10 vzorků pro skot a až 5 vzorků pro malé přežvýkavce):**

**Protokol s krátkou inkubací**

1. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 50 μl ředícího pufru 19 do každé jamky.

- 50 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 50 μl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 50 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

1. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 5 minut při teplotě 37 °C (± 3 °C).

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

**Protokol s inkubací přes noc**

1. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 90 μl ředícího pufru 19 do každé jamky.

- 10 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 10 μl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 10 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte přes noc (16-20 hodin) při teplotě 5 °C (±3 °C).

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

**Shodný pokračovací protokol**

4. Přidejte 100 μl konjugátu připraveného k použití do každé jamky.

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

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

7. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku substrátu.

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

9. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 7, aby se zastavila reakce.

10. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

* střední hodnota negativní kontroly OD (ODNC) je vyšší než 0,7.



* poměr středních hodnot pozitivní kontroly (ODPC) a negativní kontroly (ODNC) je nižší než 0,3.

 

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Výsledek** | **Séroprevalence** | **Výklad** |
| **S/N < 35 %** | **Prevalence P80 séropozitivních zvířat je pravděpodobně nad 50 %.** | **Podezření na proběhlou nebo probíhající virovou cirkulaci.** |
| **S/N ≥ 35 %** | **Prevalence P80 séropozitivních zvířat je pravděpodobně pod 50 %.** | **Nízká pravděpodobnost akutní virové cirkulace.** |

**Vyhodnocení:**

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



***Individuální vzorky séra nebo plasmy:***

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/N ≤ 40 %** | **POZITIVNÍ** |
| **40% < S/N ≤ 50 %** | **HRANIČNÍ** |
| **S/N > 50 %** | **NEGATIVNÍ** |

***Směsné vzorky séra nebo plasmy:***

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/N < 60 %** | **POZITIVNÍ** |
| **S/N ≥ 60 %** | **NEGATIVNÍ** |

Korelace mezi hodnotami S/N směsných vzorků séra nebo plazmy a séroprevalencí ve stádě:

**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**

**Vzorky mléka**

(vzorky séra nebo plazmy viz. protokol 1 / 2)

**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**

**BVD p80 Antibody Competition**



**Kompetitivní ELISA pro detekci protilátek proti BVD/MD/BD viru p80-125 (NSP2-3) v séru, plazmě nebo mléce (individuální nebo směsné vzorky) u ovcí, koz,**

**skotu a ostatních vnímavých druhů zvířat**

**Protokol 1 / 2**

**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava je určena pro detekci specifických protilátek proti proteinu p80-125 známého jako NSP2-3 viru bovinní virové diarey (Bovine viral diarrhoea/Mucosal Disease/Border Disease) pomocí metody ELISA založené na principu kompetice.

Tento test lze použít s hovězím sérem nebo plazmou (jednotlivé nebo směsné vzorky až do 10 vzorků) nebo mlékem (jednotlivé nebo hromadné vzorky) pro diagnostiku virové diarey skotu (BVD) a/nebo slizničního onemocnění (MD).

Tento test lze také použít pro vzorky séra nebo plazmy malých přežvýkavců (jednotlivé vzorky nebo směsné vzorky o maximálním počtu 5 vzorků) pro diagnostiku hraniční choroby (BD).

Tento dokument popisuje návod k použití pro vzorky mléka. Při zpracování vzorků séra nebo plazmy nahlédněte do protokolu pro vzorky séra nebo plazmy (Protokol 1/2).

**Popis a princip**

Mikrodestičky jsou potaženy přečištěným antigenem p80 izolovaným z viru BVD. Vzorky, které mají být testovány a kontroly se přidají do jamek mikrotitrační destičky. Protilátky proti antigenu p80, pokud jsou ve vzorku přítomny, vytvoří komplex antigen-protilátka. V dalším kroku se do jamek přidá konjugát anti-p80 označený křenovou peroxidázou (HRP). Tento konjugát se naváže na komplex antigen-protilátka, čímž vytvoří konjugovaný komplex antigen-protilátka-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 p80-125 |
| Konjugát připravený k použití |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Mléčná negativní kontrola |
| Ředící pufr |
| Promývací roztok (20x) |
| Substrátový roztok (TMB) |
| Zastavovací roztok (0,5M) |

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

1. Konjugát, 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.
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 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**

V případě potřeby uveďte promývací koncentrát (20X) do pokojové teploty a důkladně promáchejte, abyste zajistili, že promývací koncentrát bude mít dostatečnou teplotu. Promývací roztok (1x) připravte zředěním promývacího koncentrátu (1x) (20x) na 1/20 v destilované/deionizované vodě. Kvalita promývacího kroku může ovlivnit výsledky. Ujistěte se, aby byly jamky mezi promýváním zcela prázdné. Pokud používáte automatickou promývačku, je mimořádně důležité, abyste správně parametrů zařízení (režim, typ aspirace, výška aspirace). Další informace naleznete "Průvodce praním ID.Vet", který je k dispozici na vyžádání.

**Postup testování vzorků mléka**

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.

Tento test lze provést na odstředěném i plnotučném mléce s konzervačními látkami nebo bez konzervačních látek. Při analýze vzorků plnotučného mléka je třeba provést mimořádné promytí a je třeba dodržet zvláštní opatření (viz. část "Doporučení pro testování mléka"). Každý vzorek plnotučného mléka odstřeďte nebo nechte vzorky pouze odstát, aby se oddělila smetana a veškerý tuk od laktoséra (smetana nahoře, laktosérum dole). K analýze odeberte pouze laktosérum, dejte pozor, abyste neodebrali tukovou vrstvu.

**"CITLIVÝ" PROTOKOL**

**individuální a směsné vzorky mléka**

1. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 100 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 100 μl mléčné negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 100 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte přes noc

(16-20 hodin) při teplotě 5 °C (± 3 °C).

3. Vyprázdněte jamky. Každou jamku 5krát promyjte nejméně 300 μl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily. Dávejte pozor, aby v jamkách nezůstal po promytí žádný tukový kroužek. Abyste zabránili usazování zbytků tuku v jamkách, můžete zařadit mezi jednotlivé promývací kroky dobu namáčení 2-5 minut.

**"KVANTITATIVNÍ" PROTOKOL**

**pouze směsné vzorky mléka**

1. Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 150 μl ředícího pufru 19 do každé jamky.

- 50 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 50 μl mléčné negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 50 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 2 hodiny ± 12 minut při teplotě 37 °C (± 2 °C).

3. Vyprázdněte jamky. Každou jamku 5krát promyjte nejméně 300 μl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily. Dávejte pozor, aby v jamkách nezůstal po promytí žádný tukový kroužek. Abyste zabránili usazování zbytků tuku v jamkách, můžete zařadit mezi jednotlivé promývací kroky dobu namáčení 2-5 minut.

**SHODNÝ POKRAČUJÍCÍ PROTOKOL**

4. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku konjugátu připraveného k použití.

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

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

7. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku substrátu.

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

9. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 7, aby se zastavila reakce.

10. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

* střední hodnota negativní kontroly OD (ODNC) je vyšší než 0,7.



* poměr středních hodnot pozitivní kontroly (ODPC) a negativní kontroly (ODNC) je nižší než 0,3.

**Vyhodnocení:**

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



Alternativně také procento inhibice PI (PI%):

 **Citlivý protokol – samostatné vzorky mléka**

**ID Screen**

**BVD p80 Antibody Competition**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Výsledek S/N %** | **Výsledek PI %** | **Hodnocení** |
| **S/N > 65 %** | **PI < 35 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **S/N ≤ 65 %** | **PI ≥ 35 %** | **POZITIVNÍ** |

**Citlivý protokol – směsné vzorky mléka**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Výsledek S/N %** | **Výsledek PI %** | **Séro-prevalence** |
| **S/N > 65 %** | **PI < 35 %** | **< 2 %** |
| **S/N ≤ 65 %** | **PI ≥ 35 %** | **≥ 2 %** |

**Kvantitativní protokol – směsné vzorky mléka**

**Kompetitivní ELISA pro detekci protilátek proti BVD/MD/BD viru p80-125 (NSP2-3) v séru, plazmě nebo mléce (individuální nebo směsné vzorky) u ovcí, koz, skotu a ostatních vnímavých druhů zvířat**

**Protokol 2 / 2**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Výsledek S/N %** | **Výsledek PI %** | **Séro-prevalence** |
| **S/N > 65 %** | **PI < 35 %** | **< 10 %** |
| **40 % < S/N ≤ 65 %** | **35 % ≤ PI < 60 %** | **10-30 %** |
| **S/N ≤ 40 %** | **PI ≥ 60 %** | **≥ 30 %** |

**Poznámka 1:** Významná změna v séroprevalenci mezi 2 odebranými vzorky naznačuje cirkulaci a/nebo riziko přítomnosti viru (aktuální nebo čekající) ve stádě. Stabilita séroprevalence svědčí o nepřítomnosti aktivní virové cirkulace a naznačuje dříve prodělanou infekci.

**Poznámka 2**: 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.



**Vzorky séra nebo plazmy**

(vzorky mléka viz. protokol 2/2)

**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**