

# INGEZIM IBR 2.0

12.BHV.K1

Nepřímá enzymatická imunoanalýza pro stanovení protilátek / titru protilátek infekčního bovinního herpesviru typ 1 (BoHV-1), v bovinním séru, plazmě a mléce.

POUZE PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ IN VITRO!

12.BHV.K1 Poslední revize: 28-05-18

|  |  |
| --- | --- |
| **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 | 0,25 ml | 2 | 0,25 ml |
| Lahvičky s negativní kontrolou. | 1 | 0,25 ml | 2 | 0,25 ml |
| Lahvičky s konjugátem 100x koncentrovaným (MAb konjugovaná peroxidázou), pro použití u séra – žluté víčko | 1 | 300 µl | 2 | 300 µl |
| Lahvičky s konjugátem 100x koncentrovaným (MAb konjugovaná peroxidázou), pro použití u mléka – zelené víčko | 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 | 65 ml | 1 | 65 ml |
| Lahvičky s ředícím roztokem konjugátu (DE08-01) | 1 | 65 ml | 1 | 65 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 BoHV-1 (Bovinní herpesvirus, typ 1) u skotu postiženého infekční bovinní rhinotracheitiou (IBR).

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

Jestliže vzorek obsahuje protilátky specifické k viru, dojde k navázání konjugátu k destičce, pokud vzorek specifické protilátky neosahuje, k navázání konjugátu nedojde. Antigen je vázaný na pevnou podložku (polystyrenová destička). Pokud vzorek séra obsahuje protilátky proti viru, naváží se na antigen adsorbovaný na destičce. Po promytí, které odstraní přebytečný nevázaný materiál ze vzorku séra, můžeme přidáním substrátu detekovat přítomnost nebo nepřítomnost značeného konjugátu. Substrát v přítomnost peroxidázy vykazuje barevnou reakci.

Souprava je použitelná pro vzorky séra a mléka (individuální nebo tankové vzorky).

### 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 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 1/5 pomocí ředícího roztoku dodávaného v soupravě (DE01-01). Tento krok lze provést přímo v jamkách destičky přidáním 80 µl ředícího roztoku a 20 µl vzorku séra.

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 ředícím roztokem DE08-1.

Pro vzorky séra použijte konjugát se žlutým víčkem

Pro vzorky mléka použijte konjugát se zeleným víčkem

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 1/5 ředícím roztokem DE01-1, pro vzorky séra i mléka.

POZOR: Pokud nejsou otevřené lahvičky kontrolního séra spotřebovány v krátké době, doporučujeme skladovat při teplotě -20 °C.

### VII. – POSTUP

1. Před vlastní testem ohřejte všechny reagencie (kromě konjugátu) na laboratorní teplotu 20–25 °C.
2. přidejte vzorky (sérum nebo mléko)
3. 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 stanovení vzorků i kontrol v duplikátech. **V případě vzorků séra inkubujte 45 minut při 37 °C.**
4. Promyjte 4x dle uvedeného postupu.
5. Přidejte 100 µl konjugátu do každé jamky (připraveného podle výše uvedeného postupu). **Inkubujte 45 minut při 37 °C**.
6. Promyjte 5x dle uvedeného postupu.
7. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky. **Inkubujte destičku 15 minut (sérum) nebo 5 minut (mléko).**
8. Inkubace pobíhá při pokojové teplotě na temném místě. Čas počítejte od přidání substrátu do první jamky. Doporučuje se použití vícekanálové pipety pro maximální urychlení tohoto kroku.
9. Přidejte 100 µl STOP činidla do každé jamky. STOP činidlo musí být pipetováno ve stejném pořadí jako substrát.
10. 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**. Pokud jsou vzorky vyšetřovány v duplikátech, je třeba stanovit aritmetický průměr OD pro daný vzorek. Stejně tak je třeba spočítat aritmetický průměr pro příslušné kontroly.

A) OVĚŘENÍ TESTU:

Test je platný jestliže:

SÉRUM:

Hodnota OD pozitivní kontroly (ředění 1/5) je vyšší než 0,8

Hodnota OD negativní kontroly (ředění 1/5) je nižší než 0,3

MLÉKO:

Hodnota OD pozitivní kontroly (ředění 1/5) je vyšší než 1,0

Hodnota OD negativní kontroly (ředění 1/5) je nižší než 0,40

B) INTERPRETACE VÝSLEDKŮ (kalkulace „cut off“)

SÉRUM:

Vypočítejte poměr S/P (vzorek / pozitivní kontrola) podle vzorce:

S/P = (S – NC) / (PC – NC)

Kde S je OD vzorku, NC je OD negativní kontroly a PC je OD pozitivní kontroly.

**Pozitivní / Negativní „cut off“**

**Hodnota cut-off je 0,18.**

Vzorky, které vykazují hodnotu S/P stejnou nebo vyšší než „cut-off“ jsou považovány za pozitivní.

Vzorky, které vykazují hodnotu nižší, jsou negativní.

MLÉKO:

Vypočítejte poměr S/P (vzorek / pozitivní kontrola) podle vzorce:

S/P = (S – NC) / (PC – NC)

Kde S je OD vzorku, NC je OD negativní kontroly a PC je OD pozitivní kontroly.

**Pozitivní / Negativní „cut off“**

**Průměr OD450 negativní kontroly + 0,1.**

Vzorky, které vykazují hodnotu S/P stejnou nebo vyšší než „cut-off“ jsou považovány za pozitivní.

Vzorky, které vykazují hodnotu nižší, jsou negativní.