|  |
| --- |
| **Detekce protilátek proti *Mycobacterium bovis* metodou ELISA** |



**BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0**

* **Princip testu**

BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0 je test pro kvalitativní detekci protilátek proti *Mycobacterium bovis* v séru založený na principu ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0 obsahuje mikrotitrační destičky, které jsou v jamkách potaženy přečištěným antigenem *M. bovis*. Při analýze vzorku se mikrotitrační destičky ELISA potažené antigenem inkubují se stejnou směsí séra a konjugátu antigenu *M. bovis-HRP* po dobu 60 minut při teplotě 37 °C. Během inkubace se protilátky proti *M. bovis* přítomné v testovaném vzorku vážou na přečištěný antigen *M. bovis*, který je nanesený každé v jamce a na konjugát. Po této inkubaci se veškerý nezreagovaný antigen odsaje a po promytí následuje přidání substrátu TMB. Zbytková enzymová aktivita změřená v jamce je přímo úměrná koncentraci konjugátu ve vzorku a prokáže se inkubací pevné fáze se substrátem TMB. Reakce se zastaví přidáním stop roztoku a kolorimetrické měření se provede pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm a s referenční vlnovou délkou 620 nm.

Jako záchytný materiál se v testu používají speciálně vybrané antigeny *M. bovis*. Díky nim může test BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0 identifikovat protilátky proti *M. bovis* ve vzorku s vysokou přesností.

* **Dodané materiály v soupravě**

BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0 obsahuje následující položky k provedení testu.

1. Mikrotitrační destička potažená antigenem *M. bovis* (1)
2. Negativní kontrola (2)
3. Pozitivní kontrola (3)
4. Promývací roztok 10x (4)
5. Enzymový konjugát (5)
6. Substrát TMB (6)
7. Stop roztok (7)
8. Těsnicí fólie destičky (8)
9. Návod k použití (9)

* **Nezbytné materiály, které nejsou součástí soupravy**
* Přesné pipety nebo pipetovací zařízení pro vícenásobné dávkování vhodné pro dávkování 10 až 1000 µl
* Jednorázové pipetovací špičky
* 500 ml odměrný válec na promývací roztok
* 96jamková čtečka destiček
* Destilovaná nebo deionizovaná voda
* Odstředivka

* **Bezpečnostní opatření**

Pro získání reprodukovatelných výsledků je třeba dodržovat následující pravidla:

1. Pouze pro diagnostiku *in vitro*. Pouze pro zvířata. Veterinární přípravek.
2. Ihned po použití uložte obsah soupravy ke skladování při teplotě 2–8 °C. Mikrotitrační destičku (1) nepoužívejte opakovaně a po dávkování nevracejte činidla zpět do původních lahviček.
3. Reakční činidla nepoužívejte po uplynutí exspirace.
4. Nemíchejte činidla různých šarží.
5. Při manipulaci s potenciálně infekčními materiály používejte rukavice. Po manipulaci si umyjte ruce dezinfekčními prostředky.
6. Hemolytické vzorky by měly být před použitím odstředěny, aby se zabránilo rušení buněčných složek.
7. Před provedením testu vyčistěte zařízení ELISA a testovací prostor. To může ovlivnit výsledek testu.
8. Krevní buňky ve vzorcích mohou rovněž vyvolat nespecifickou reakci.
9. Se substrátem TMB (6) a stop roztokem (7) je třeba zacházet opatrně. Zabraňte kontaktu s kůží, očima a sliznicemi. V případě nehody důkladně omyjte tekoucí vodou.
10. Obaly a zbytky likvidujte v souladu s místními právními předpisy.
11. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

* **Odběr a skladování vzorků**
1. Pro tento test lze použít čerstvé vzorky séra. Hemolyzované nebo kontaminované vzorky mohou poskytnout chybné výsledky. Krevní buňky ve vzorcích mohou rovněž poskytnout nespecifickou reakci.
2. Vzorky důkladně promíchejte pomalým převracením. V některých případech může být potřeba odstranit viditelné částice ze vzorků odstředěním při nízkých otáčkách.
3. Vzorky séra by měly být inaktivovány při 56 °C po dobu 30 minut.
4. Vzorky séra by měly být skladovány při teplotě 2–8 °C. Pro delší skladování (více než 3 dny) zamrazte vzorky při –20 °C nebo nižší teplotě. Vyvarujte se opakovaného zmrazování a rozmrazování.
5. Hemolytické nebo kontaminované vzorky netestujte.
6. Azid sodný ve vzorku ovlivňuje výsledek testu.

* **Příprava činidla a vzorků**
1. Nepoužitá mikrotitrační destička (1) musí být uzavřena silikagelem v přiloženém těsnícím sáčku a skladována při teplotě 2–8 °C.
2. **Promývací roztok** **10x** (4): Koncentrovaný promývací roztok 10x (4) se musí před použitím zředit v poměru 1:9 destilovanou/deionizovanou vodou (tj. přidejte 100 ml promývacího roztoku 10x (4) do 900 ml destilované/deionizované vody) a dobře promíchejte. Pokud jsou přítomny nerozpuštěné krystaly, roztok pozvolna zahřívejte při 37 °C. Hotový roztok skladujte při teplotě 2–30 °C.

* **Postup testu**
1. Před použitím nechte všechna činidla a vzorky 30 minut ohřát na pokojovou teplotu (18–25 °C).
2. Připravte jamky pro negativní kontrolu (2 jamky), pro pozitivní kontrolu (2 jamky) a všechny ostatní jamky pro vzorky
3. Přidejte 50 µl negativní kontroly, pozitivní kontroly do 2 jamek a 50 µl vzorků do každé jamky.
4. Do každé jamky přidejte 50 µl enzymového konjugátu.
5. Jamky zakryjte těsnící fólií na destičky a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 60 minut.
6. Jamky 6krát promyjte 350 µl naředěného promývacího roztoku. Odsajte veškerou kapalinu z jamek.
7. Do každé jamky přidejte 100 µl substrátu TMB.
8. Jamky zakryjte těsnící fólií na destičky a inkubujte 15 minut v temnu při pokojové teplotě (18–25 °C).
9. Do každé jamky přidejte 100 µl stop roztoku. Promíchejte jemným protřepáním.
10. Změřte absorbanci jamek bichromatickým spektrofotometrem při 450 nm s referenční vlnovou délkou 620 nm. Zjištění hodnot musí být dokončeno do 30 minut od ukončení testu.

* **Hodnocení výsledků**
1. Kontrola testu

➀ Střední hodnota OD negativní kontroly (ODNCx) by měla být nižší než **0,150.**

➁ Střední hodnota OD pozitivní kontroly (ODPCx) by měla být vyšší než **1,500**.

➂ Pokud některá z těchto hodnot není v očekávaném rozmezí, měl by být test BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0 považován za neplatný a vzorky by měly být testovány znovu.

1. Výpočet hodnoty S/P

S/P = $\frac{(OD\_{sample}- OD\_{NCx})}{(OD\_{PCx}- OD\_{NCx})}$

1. Hodnocení výsledků

Po výpočtu hodnoty S/P je třeba určit kladnou a zápornou hodnotu na základě následujících kritérií S/P.

➀ Pozitivní: S/P vzorku ≥ 0,5

➁ Negativní: S/P vzorku < 0,3

➂ Podezření na pozitivní: 0,3 ≤ S/P vzorku < 0,5

* Konečnou diagnózu nelze stanovit pouze na základě výsledků tohoto testu, protože tento přípravek nemůže zcela vyloučit možnost falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků v důsledku různých faktorů. Musí být použit profesionálním veterinárním lékařem a konečná diagnóza musí být stanovena na základě výsledků tohoto přípravku, dalších výsledků testů a klinických nálezů.

* **Omezení**
1. Při testování je třeba dodržovat schválený postup, bezpečnostní opatření a hodnocení výsledků předepsané pro tuto testovací soupravu.

* **Skladování a stabilita**
1. Souprava BIONOTE BTB Ab ELISA 2.0 by měla být skladována při teplotě 2–8 °C. Neotevřená testovací souprava je stabilní do data exspirace vytištěného na obalu a na štítku každého materiálu / činidla.
2. Stabilita již otevřených materiálů / činidel:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Reakční činidla** | **Skupenství** | **Skladování** | **Stabilita** |
| Pracovní promývací roztok | Zředěný v poměru 1:9 | 2–30 °C | 1 týden |

* **Obalová jednotka**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Množství****Reakční činidla** | **96 testů v soupravě** | **480 testů v soupravě** | **960 testů v soupravě** |
| Mikrodestičky potažené antigenem (1) | 1 destička | 5 destiček | 10 destiček |
| Negativní kontrola (2) | 1 zkumavka (0,5 ml) | 1 zkumavka (2,5 ml) | 1 zkumavka (4,5 ml) |
| Pozitivní kontrola (3) | 1 zkumavka (0,5 ml) | 1 zkumavka (2,5 ml) | 1 zkumavka (4,5 ml) |
| Promývací roztok 10x (4) | 1 lahvička (50 ml) | 1 lahvička (250 ml) | 2 lahvičky (250 ml) |
| Enzymový konjugát (5) | 1 lahvička (8 ml) | 1 lahvička (40 ml) | 1 ampulka (80 ml) |
| Substrát TMB (6) | 1 lahvička (12 ml) | 1 lahvička (60 ml) | 1 lahvička (120 ml) |
| Stop roztok (7) | 1 lahvička (15 ml) | 1 lahvička (80 ml) | 1 lahvička (150 ml) |
| Těsnící fólie destičky (8) | 2 ks | 10 ks | 20 ks |
| Návod k použití (9) | 1 ks | 1 ks | 1 ks |

**Bezpečnostní upozornění:**

**Se substrátem TMB (6) a stop roztokem (7) je třeba zacházet opatrně. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou, očima a sliznicemi. V případě nehody důkladně omyjte vodou a vyhledejte lékaře.**

**H věty:**

H301: Škodlivý při polknutí (kategorie 3)

H310: Škodlivý při kontaktu s pokožkou (kategorie 1)

H330: Škodlivý při vdechování (kategorie 1)

H411: Škodlivý pro vodní živočichy (kategorie 2)

**P Věty:**

P260: Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.

P262: Zabraňte vniknutí do očí, na kůži nebo na oděv.

P264: Po manipulaci si důkladně umyjte ruce.

P270: Při používání tohoto produktu nejezte, nepijte ani nekuřte.

P271: Používejte pouze venku nebo v dobře větraných prostorách.

P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít/ochranu sluchu.

P284: V případě nedostatečného větrání používejte ochranu dýchacích cest.

***Výrobce***

**BioNote, Inc.**

22 Samsung1ro 4-gil, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18449, Korejská republika

TEL.: 82-31-211-0516 I FAX: 82-31-8003-0618 I www.bionote.co.kr

