

TestLine
Clinical
Diagnostics



Návod na použitie

BHV-1 Ab ELISA

REF BHd480



Súprava na profesionálne použitie

GMP



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. &
Křížíkova 68, 612 00 Brno, Czech Republic
Tel.: +420 541 248 311
FAX: +420 541 243 390
E-mail: info@testlinecd.com
www.testlinecd.cz
www.testlinecd.com



Veterinary Research Institute
Hudcova 70, 621 32 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 533 331 111
FAX.: +420 541 211 229
E-mail: podatelna@vri.cz
www.vri.cz

OBSAH

1	Úvod	3
2	Princíp testu.....	4
3	Zloženie súpravy	5
4	Ďalšie potrebné vybavenie na vykonanie testu	6
5	Skladovanie a exspirácia súpravy	6
6	Príprava pracovných roztokov	6
7	Riedenie vzoriek a kontrolných sér	7
8	Pracovný postup	8
9	Pracovná schéma	10
10	Validita testu.....	11
11	Hodnotenie výsledkov.....	11
12	Bezpečnosť práce	12
13	Technické pripomienky	13
14	Vysvetlenie symbolov	14

Imunoenzymatická súprava na skriningové stanovenie protilátok proti bovinému herpetickému vírusu-1 v hovädzom sére a mlieku

1 Úvod

Infekčná boviná rinotracheitída (IBR) je ochorenie hovädzieho dobytku spôsobené boviným herpetickým vírusom 1 (BHV-1) z čeľade *Herpesviridae*. Na infekciu je vnímavý len hovädzí dobytok. Infekčný proces prebieha buď úplne skryto, alebo sa manifestuje v rôznych klinických formách. Ochorenie sa najčastejšie prejavuje ako rinotracheitída a vulvovaginitída, obvyklé sú aj poruchy reprodukcie a aborty. V prípade infikovaných zvierat navodzuje vírus stav latentnej infekcie a perzistuje v ich organizme bez akýchkoľvek klinických príznakov celý život.

Latentnú infekciu sprevádza:

- adekvátna imunologická reakcia, predovšetkým tvorba špecifických antivírusových protilátok
- nepravidelné, intermitentné vylučovanie vírusu do vonkajšieho prostredia.

Infikované zvieratá sa tak stávajú trvalým zdrojom infekcie a rozhodujúcim faktorom umožňujúcim šírenie nákazy. Spoľahlivá identifikácia týchto zvierat je základným východiskom pre kontrolu nákazy a realizáciu programu ozdravovania.

Diagnostika ochorenia je vzhľadom na absenciu klinických príznakov latentne infikovaných zvierat možná len sérologicky, a to na základe pozitívneho preukázania antivírusových protilátok v krvných sérach hovädzieho dobytku. Okrem tejto základnej indikácie, t. j. vyhľadávania latentne infikovaných zvierat, sa môže súprava využiť na potvrdenie klinického podozrenia z výskytu nákazy, na overenie cirkulácie vírusu v chovoch a na kontrolu účinnosti vakcinácie.

Citlivosť súpravy je nastavená na Medzinárodné štandardné sérum BHV-1 (EU2).

2 Princíp testu

Súprava umožňuje detekciu špecifických protilátok vo vzorke metódou EIA, typ sandwich (t. j. pevná fáza s naviazaným špecifickým antigénom – protilátka z vyšetrovanej vzorky – značená protilátka). Značená protilátka (konjugát) je zvieracia imunoglobulínová frakcia proti hovädziemu imunoglobulínu konjugovaná chrenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita sa stanovuje pomocou substrátu s TMB, ktorý zmodrie v prípade positivity. Celá reakcia je ukončená zastavovacím roztokom. Dôjde k zmene modrého zafarbenia na žlté. Intenzita žltého zafarbenia sa meria na fotometri (pri vlnovej dĺžke 450 nm) a je úmerná koncentrácii špecifických protilátok prítomných vo vzorke.

Použitý antigén

Purifikovaný a inaktivovaný antigén BHV-1

3 Zloženie súpravy

MICROPLATE	Potiahnutá platnička s naviazaným antigénom, 12 × 8 jamiek vo vrecku s vysušovačom	5 ks
NCS	Negatívne kontrolné sérum 20-krát koncentrované hovädzie sérum neobsahujúce špecifické protilátky	1 × 0,4 ml
PCS-L	Pozitívne kontrolné sérum limitné 20-krát koncentrované hovädzie sérum obsahujúce špecifické protilátky	1 × 0,4 ml
CONJUGATE	Konjugát 400-krát koncentrované kozie alebo králičie protilátky proti hovädziemu imunoglobulínu značené peroxidázou	1 × 0,25 ml
DILUENT 13	Riadiaci roztok vzoriek 13 Pufer so stabilizátormi bielkovín, v pracovnom riedení	1 × 240 ml
CONJ.DILUENT 11	Riadiaci roztok konjugátu 11 Pufer so stabilizátormi konjugátu, v pracovnom riedení	1 × 70ml
SUBSTRATE 5	TMB-Complete 5 Jednozložkový substrátový roztok obsahujúci TMB/H ₂ O ₂ , v pracovnom riedení	1 × 60 ml
WASH 20x	Premývací roztok 20-krát koncentrovaný pufer	2 × 60 ml
STOP	Zastavovací roztok Roztok kyseliny, v pracovnom riedení	1 × 60 ml
	Pracovný návod	1 ks

4 Ďalšie potrebné vybavenie na vykonanie testu

Jednokanálová a viackanálové pipety

Špičky na jednorazové použitie

Premývacie zariadenie

Stopky

Trepačka mikrotitračných platničiek (pri vyšetrowaní menších súborov vzoriek nie je nevyhnutná)

Termostat na 37 °C s vlhkou komôrkou

Fotometer na mikrotitračné platničky

5 Skladovanie a expirácia súpravy

Súpravu skladujte pri teplote +2 °C až +8 °C. Pri dodržaní skladovacích podmienok platí expirácia uvedená na obale súpravy (15 mesiacov od dátumu výroby). Po otvorení sa odporúča súpravu spotrebovať do 3 mesiacov. Súprava nesmie zmrznúť!

Vzorky a ich skladovanie

Ako vzorka na vyšetrenie sa môže použiť krvné sérum, plazma a vzorky mlieka (individuálne, zmesné a bazénové). Vyšetrowané vzorky (sérum, plazma, mlieko) je možné uchovávať pri teplote +2 °C až +8 °C maximálne 48 hodín.

Vzorky mlieka sa môžu konzervovať napr. Bronopolom. Takto konzervované vzorky mlieka je možné skladovať pri teplote +2 °C až +8 °C maximálne 6 dní.

Pri dlhšom skladovaní zmrazte vzorky na -20 °C.

6 Príprava pracovných roztokov

Premývací roztok riedte v pomere 1:20. Napr. 60 ml koncentrovaného Premývacieho roztoku + 1140 ml destilovanej vody (na 1 platničku 15 ml Premývacieho roztoku + 285 ml destilovanej vody).

Vo fľaštičke s Premývacím roztokom sa môžu vytvoriť kryštály solí. Tieto kryštály je potrebné pred použitím rozpustiť zahriatím vo vodnom kúpeli. Roztok je po zriedení stabilný jeden týždeň pri teplote +2 °C až +8 °C.

Riediaci roztok vzoriek je už v pracovnej koncentrácii, ďalej neriediť!

Riediaci roztok konjugátu je už v pracovnej koncentrácii, ďalej neriediť!

Konjugát riedte v pomere 1:400 Riediacim roztokom konjugátu. Napr. 175 µl Konjugátu doplňte Riediacim roztokom konjugátu do celkového objemu 70 ml (na jednu platničku: 30 µl do 12 ml, pre jeden strip 2,5 µl do 1 ml).

Riedenie vykonávajte najskôr 10 minút pred použitím. Dobre premiešajte!

TMB-Complete je jednozložkový chromogénny substrátový roztok v pracovnom riedení, ďalej neriediť!

Zameniteľnosť roztokov

Riediacci roztok vzoriek, Riediacci roztok konjugátu a TMB-Complete sú v EIA súpravách TestLine zameniteľné, ak majú rovnaké číselné označenie (napr. Riediacci roztok vzoriek 2, Riediacci roztok vzoriek 3 atď.). Premývací a Zastavovací roztok je univerzálny vo všetkých EIA súpravách TestLine.

7 Riedenie vzoriek a kontrolných sér

Riediacci roztok vzoriek pred použitím šetrne premiešajte.

Riedenie vzoriek a kontrolných sér

Dôkladne premiešané vzorky a kontrolné séra (PKS-L a NKS) riedíte v pomere 1:20 Riediaccim roztokom vzoriek:

napr.: 10 µl vzorky (kontrolného séra) + 190 µl Riediaceho roztoku vzoriek.

Riedenie vykonávajú v jamkách mikrotitračnej platničky (pozri kapitolu Pracovný postup). Dobre premiešajte.

Zriedené vzorky je nutné vyšetriť čo najskôr.

Príprava vzoriek mlieka

Vzorky mlieka (individuálne, zmesné a bazénové) sa vyšetrujú neriedené.

Vzorky mlieka sa centrifugujú, alebo sa nechajú sadnúť tak, že sa tuk oddelí od mliečného séra (tuk hore, sérum dole). Pri pipetovaní zaveďte špičku pod tuk, vyšetruje sa mliečne sérum.

8 Pracovný postup

Všetky reagencie nechajte vytemperovať na laboratórnu teplotu a dôkladne premiešajte. Ak nepoužijete celú platničku, zvyšné stripy vráťte späť do obalu s vysušovačom, hermeticky uzavrite a skladujte pri teplote +2 °C až +8 °C. Dôsledne chráňte pred vlhkosťou!

1. Kontroly a vzorky dávajte podľa pracovnej schémy.

Vzorky séra alebo plazmy

- Pipetujte 200 µl Riediaceho roztoku vzoriek do jamky A1 (blank).
- Pipetujte 190 µl Riediaceho roztoku vzoriek do všetkých zvyšných jamiek.
- Pipetujte 10 µl Negatívneho kontrolného séra do 2 jamiek (B1, C1).
- Pipetujte 10 µl Pozitívneho kontrolného séra limitného do 2 jamiek (D1, E1).
- Pipetujte 10 µl testovaných vzoriek do zvyšných jamiek s Riediacim roztokom vzoriek (F1 – H12).
- Obsah jamiek dôkladne premiešajte (najlepšie pomocou trepačky mikrotitračných platničiek).

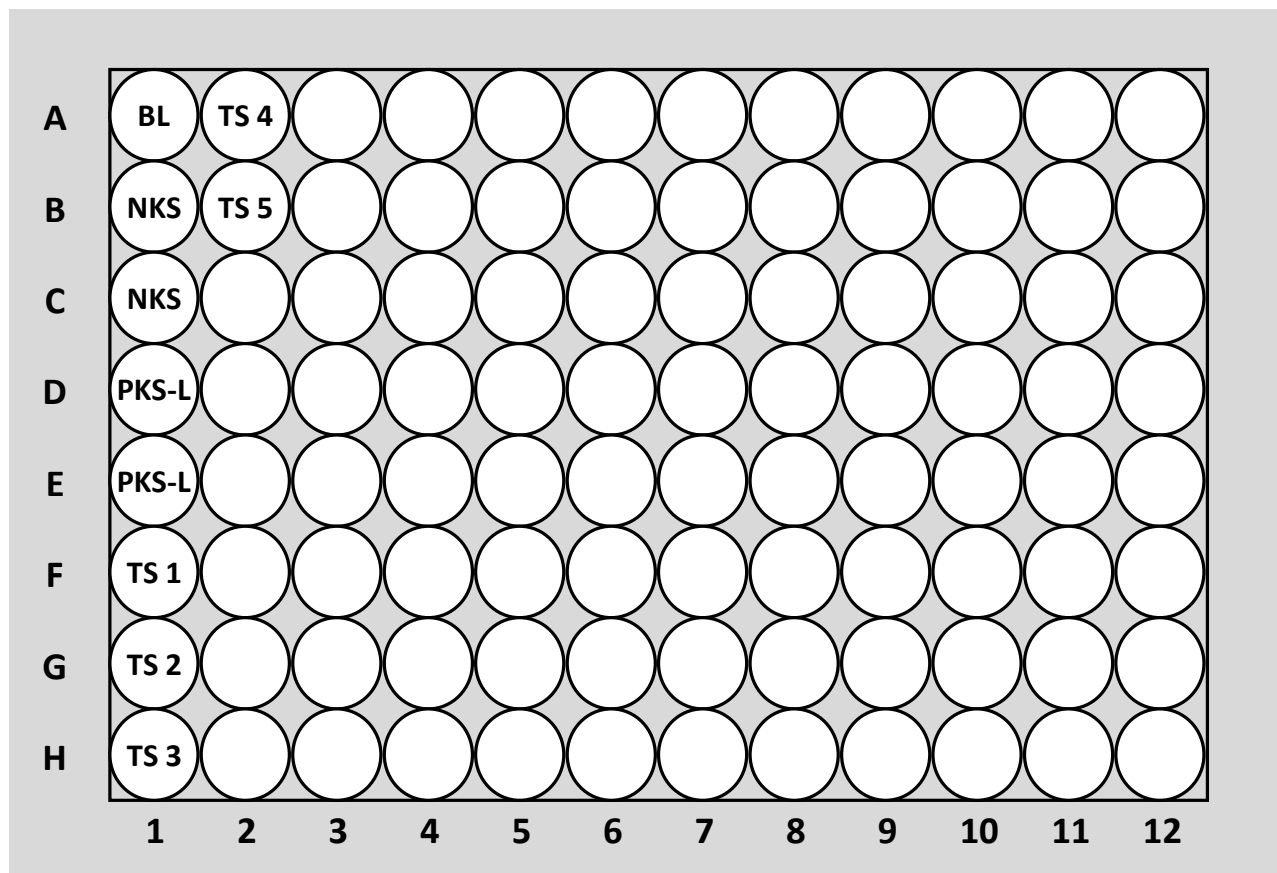
Vzorky mlieka

- Pipetujte 200 µl Riediaceho roztoku vzoriek do jamky A1 (blank).
 - Pipetujte 190 µl Riediaceho roztoku vzoriek a 10 µl Negatívneho kontrolného séra do 2 jamiek (B1, C1).
 - Pipetujte 190 µl Riediaceho roztoku vzoriek a 10 µl Pozitívneho kontrolného séra limitného do 2 jamiek (D1, E1).
 - Pipetujte 100 µl neriedenej vzorky mliečného séra do zvyšných jamiek (F1 - H12).
 - Obsah jamiek dôkladne premiešajte (najlepšie pomocou trepačky mikrotitračných platničiek).
2. Platničku prikryte viečkom a inkubujte 60 minút pri teplote 37 °C.
3. Odsajte obsah jamiek a 4-krát premyte pracovným premývacím roztokom. Jamky plňte po horný okraj. Na záver dôkladne vyklepte zvyšky roztoku do nasiakavého materiálu. Dbajte na to, aby boli jamky so vzorkami mlieka dôkladne premyté (v jamke nesmie zostať tukový krúžok).
4. Do všetkých jamiek nadávajte 100 µl pracovného roztoku konjugátu.
5. Platničku prikryte viečkom a inkubujte 30 minút pri teplote 37 °C.
6. Odsajte obsah jamiek a 4-krát premyte pracovným premývacím roztokom. Jamky plňte po horný okraj. Na záver dôkladne vyklepte zvyšky roztoku do nasiakavého materiálu.
7. Do všetkých jamiek nadávajte 100 µl jednozložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečistenie – pozri kapitolu Technické pripomienky.

8. Platničku prikryte viečkom a inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote. Pozorne sledujte vývoj modrého sfarbenia, najmä v jamkách s pozitívnym kontrolným sérom limitným.
9. Reakciu zastavte pridaním 100 μ l Zastavovacieho roztoku v rovnakom poradí a intervaloch, ako sa dávkoval substrát.
10. Do 30 minút po zastavení reakcie zmerajte na fotometri pri vlnovej dĺžke 450 nm intenzitu sfarbenia roztokov v jamkách oproti blanku (jamka A1).

V prípade celkovo slabšej reakcie, spôsobenej napr. nižšou laboratórnou teplotou, je možné predĺžiť inkubáciu so substrátom až na 30 minút. Reakciu zastavte v okamihu, keď intenzita sfarbenia PKS-L zodpovedá 0,500 - 2,000.

9 Pracovná schéma



Vyšetrenie séra

BL 200 μ l Riediaceho roztoku vzoriek (Blank)

NKS 200 μ l riedeného

PKS-L 200 μ l riedeného

TS 1-x 200 μ l riedeného testovaného séra

Vyšetrenie mlieka

BL 200 μ l Riediaceho roztoku vzoriek (Blank)

NKS 200 μ l riedeného

PKS-L 200 μ l riedeného

TS 1-x 100 μ l testovanej vzorky mlieka

10 Validita testu

Test je platný, ak:

Absorbancia blanku je menšia ako 0,200.

$$\text{BLANK} < 0,200$$

Absorbancia Negatívneho kontrolného séra je menšia ako 1/3 násobok absorbancie Pozitívneho kontrolného séra limitného.

$$\boxed{\text{NCS}} < 1/3 \times \boxed{\text{PCS-L}}$$

Absorbancia Pozitívneho kontrolného séra limitného je v rozmedzí 0,500 do 2,000.

$$0,500 < \boxed{\text{PCS-L}} < 2,000$$

Ak nie sú splnené tieto požiadavky, výsledok testu je neuspokojivý a musí sa opakovať.

11 Hodnotenie výsledkov

Výpočet pomeru S/P

Vydeľte absorbanciu testovanej vzorky priemernou absorbanciou Pozitívneho kontrolného séra limitného (PKS-L) nameranou v rovnakej sérii vyšetrení:

$$\text{S/P} = \frac{\text{Absorbancia vzorky}}{\text{Priemerná absorbancia PKS-L}} \times 100 \text{ [%]}$$

Interpretácie výsledkov vyšetrení sér sú uvedené v tabuľke (Tabuľka 1).

Tabuľka 1 Interpretácie výsledkov vyšetrení sér

Pomer S/P [%]	Hodnotenie
menší ako 30	negatívny
30 až 40	hraničný
väčší alebo rovný 40	pozitívny

V prípade hraničného výsledku sa odporúča zopakovať vyšetrenie z nového odberu.

Interpretácie výsledkov vyšetrení vzoriek mlieka sa uvádzajú v tabuľkách (Tabuľka 2 a Tabuľka 3).

Tabuľka 2 Interpretácie výsledkov individuálnych vzoriek mlieka

Pomer S/P [%]	Hodnotenie
menší ako 40	negatívny
väčší alebo rovný 40	pozitívny

Tabuľka 3 Interpretácie výsledkov zmesných a bazénových vzoriek mlieka

Pomer S/P [%]	Hodnotenie
menší ako 20	negatívny
väčší alebo rovný 20	pozitívny

12 Bezpečnosť práce

Súprava je určená len na diagnostické účely in vitro.

Séra, konjugát, riediaci roztok vzoriek a konjugátu a všetky materiály prichádzajúce do styku s vyšetrovanými vzorkami je nutné považovať za potenciálne infekčné.

Niektoré reagenty obsahujú toxickú zložku azid sodný. Zabráňte kontaktu s kožou.

Zastavovací roztok obsahuje zriedený roztok kyseliny. Pri práci s týmto roztokom chráňte oči a pokožku!

Je nutné dodržiavať miestne predpisy týkajúce sa bezpečnosti práce.

Prvá pomoc

Po zasiahnutí očí vyplachujte veľkým množstvom vlažnej vody a vyhľadajte lekársku pomoc. Pri kontakte s odevom a pokožkou vyzlečte všetko kontaminované oblečenie. Pokožku opláchnite veľkým množstvom vody a mydlom. Po postriekaní roztokom, ktorý obsahuje sérum, pokožku dezinfikujte. Po náhodnom požití vypláchnite ústa pitnou vodou a vyhľadajte lekársku pomoc.

Likvidácia zvyškov po vykonaní testov

Všetky pomôcky použité na vykonanie testu je nutné považovať vzhľadom na kontakt s biologickým materiálom za potenciálne infekčné. Preto ich likvidujte spoločne s biologickým odpadom.

Likvidácia súpravy po expirácii

Súpravu rozoberte na jednotlivé komponenty a zlikvidujte ich ako biologický materiál. Obaly a zvyšky obalov likvidujte ako triedený odpad podľa miestnych predpisov.

13 Technické pripomienky

Na získanie spoľahlivých výsledkov je nutné **presné dodržiavanie návodu**. Pri práci vždy používajte pomôcky najvyššej čistoty. Dávajte prednosť jednorazovým pomôckam.

Mikrotitračná platnička – pred otvorením vždy nechajte vrečko s mikrotitračnou platničkou vytemperovať na laboratórnu teplotu, aby nedošlo ku kondenzácii vodných pár na povrchu platničky.

Premývací roztok – na prípravu premývacieho roztoku s pracovným riedením používajte vysoko kvalitnú destilovanú vodu.

Premývanie – dodržujte predpísaný počet premývacích cyklov a jamky plňte vždy až po horný okraj.

TMB-Complete – pipetovaciú vaničku pre TMB-Complete nepoužívajte na iné roztoky. Zvyšok roztoku z pipetovacej vaničky nevracajte späť do fľaštičky.

Nereprodukateľné výsledky môžu pochádzať z metodických chýb, ako je najmä:

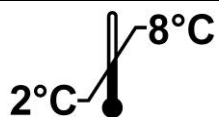
- nedostatočné premiešanie roztokov a vzoriek pred použitím
- zámena uzáverov fľaštičiek
- použitie rovnakej špičky pri pipetovaní rôznych roztokov
- vystavenie reagensí nadmernej teplote, bakteriálnej alebo chemickej kontaminácii
- nedostatočné premytie jamiek, neplnenie jamiek až po okraj, nesprávne odsatie zvyškov roztoku
- znečistenie okrajov jamiek konjugátom alebo vzorky
- zámena reagensí z rôznych šarží súprav
- kontakt reagensí s oxidantmi, ťažkými kovmi a ich soľami.

Súpravu je možno spracovávať postupne. Na prípravu pracovných roztokov odoberte len také množstvo reagensí, ktoré sa spotrebuje na analýzu.

Súpravu je možné spracovať na všetkých typoch automatických analyzátorov ELISA. V prípade potreby ponúka spoločnosť TestLine Clinical Diagnostics s. r. o. certifikovanú modifikáciu pracovného návodu pre konkrétny typ analyzátora.

Pri nedodržaní pracovného postupu výrobca nezodpovedá za správne fungovanie súpravy.

14 Vysvetlenie symbolov



Teplota skladovania



Udržovať v suchu



Použiť do dátumu



Číslo šarže



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie



Katalógové číslo















Počet testov

GMP

Správna výrobná prax

Poznámky

Schéma testu BHV-1 Ab ELISA

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Dávkovanie Riediaceho roztoku vzoriek: Blank 200 μ l Sérum alebo plazma: 190 μ l do ostatných jamiek Mlieko: 190 μ l len do jamiek pre kontrolné séra
2		Sérum alebo plazma: • Dávkovanie neriedených kontrolných sér 10 μ l Mlieko: • Dávkovanie neriedených kontrolných sér 10 μ l V oboch prípadoch okrem blanku
3		Dávkovanie vzoriek séra alebo plazmy 10 μ l Dávkovanie vzoriek mlieka 100 μ l
4		Inkubácia 60 minút pri teplote 37 °C
5		Odsatie a premytie jamiek 4-krát
6		Dávkovanie Konjugátu 100 μ l Vrátane blanku
7		Inkubácia 30 minút pri teplote 37 °C
8		Odsatie a premytie jamiek 4-krát
9		Dávkovanie substrátu (TMB-Complete) 100 μ l Vrátane blanku
10		Inkubácia 15 minút pri laboratórnej teplote.
11		Dávkovanie Zastavovacieho roztoku 100 μ l Vrátane blanku
12		Fotometrické meranie pri vlnovej dĺžke 450 nm