

Návod na použitie

IBR-gB ELISA(192)

REF IBR192



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, príprava vzoriek a riedenie kontrolných sér	7
8	Pracovní 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 detekciu špecifických protilátok proti bovinému herpetickému vírusu-1 v hovädzom sére, plazme 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 krvnom sére, plazme alebo mlieku. 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. Na tento účel slúži IBR-gB-ELISA (192) založená na metóde blocking ELISA.

2 Princíp testu

Súprava umožňuje detekciu špecifických protilátok vo vzorke metódou blocking ELISA (t. j. pevná fáza s naviazaným špecifickým antigénom – protilátka z vyšetrovanej vzorky – značená protilátka proti špecifickému antigénu na pevnej fáze). Protilátka z vyšetrovanej vzorky efektívne maskuje (blokuje) väzobné miesta (epitopy) na vírusovom glykoproteíne B (gB). Značená protilátka (konjugát) je myšia monoklonálna protilátka proti gB konjugovaná chrenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita sa stanovuje pomocou substrátu s TMB, ktorý zmodrie v prípade negativity (na pevnú fázu sa naviazali len myšie protilátky a nedošlo k väzbe protilátok zo vzorky). 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 nepriamo 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	2 ks
NCS	Negatívne kontrolné sérum Hovädzie sérum neobsahujúce špecifické protilátky, v pracovnom riedení	1 × 2 ml
PCS-L	Pozitívne kontrolné sérum limitné Hovädzie sérum obsahujúce špecifické protilátky, v pracovnom riedení	1 × 2 ml
CONJUGATE	Konjugát Myšie monoklonálne protilátky proti gB IBR značené peroxidázou, v pracovnom riedení	1 × 25 ml
DILUENT 12	Riadiaci roztok vzoriek 12 Pufer so stabilizátormi bielkovín, v pracovnom riedení	1 × 20 ml
SUBSTRATE 3	TMB-Complete 3 Jednozložkový substrátový roztok obsahujúci TMB/H ₂ O ₂ , v pracovnom riedení	1 × 25 ml
WASH 20x	Premývací roztok 20-krát koncentrovaný pufer	1 × 75 ml
STOP	Zastavovací roztok Roztok kyseliny, v pracovnom riedení	1 × 30 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 exspirácia súpravy

Súpravu skladujte pri teplote +2 °C až +8 °C. Pri dodržaní skladovacích podmienok platí exspirácia uvedená na obale súpravy (18 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, odtučnené mlieko. Vyšetrowané vzorky je možné uchovávať pri teplote +2 °C až +8 °C maximálne 48 hodín. 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.

Riediacci roztok vzoriek je v pracovnej koncentrácii, ďalej neriediť!

Konjugát je v pracovnej koncentrácii, ďalej neriediť!

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

Zameniteľnosť roztokov

Riediacci roztok vzoriek 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, príprava vzoriek a riedenie kontrolných sér

Na vyšetrenie je možné použiť čerstvé, schladené alebo rozmrazené vzorky sér, plazmy a mlieka.

Príprava vzoriek mlieka

Vzorky mlieka sa musia testovať alebo zmrazovať po odtučnení centrifugáciou 15 minút (2000 otáčok/min.), alebo po odstátí pri teplote 4 °C cez noc a následnom odstránení tuku. Dôkladne premiešajte.

Riedenie vzoriek a kontrolných sér

Riediaci roztok vzoriek pred použitím šetrne premiešajte.

Dôkladne premiešané vzorky a kontrolné séra (PKS-L a NKS) riedte v pomere 1:2 Riediacim roztokom vzoriek:

napr.: 50 µl vzorky (kontrolného séra) + 50 µl Riediaceho roztoku vzoriek.

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

Zriedené vzorky je nutné vyšetriť čo najskôr.

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 riedené vzorky dávkujte podľa pracovnej schémy.

Vzorky séra alebo plazmy

- Pipetujte 50 µl Riediaceho roztoku vzoriek do všetkých jamiek.
- Pipetujte 50 µl Negatívneho kontrolného séra do 2 jamiek (A1, B1).
- Pipetujte 50 µl Pozitívneho kontrolného séra limitného do 1 jamky (C1).
- Pipetujte 50 µl testovacích vzoriek do zvyšných jamiek. (D1 – H12).
- Obsah jamiek dôkladne premiešajte (najlepšie pomocou trepačky mikrotitračných platničiek).
- Platničku prikryte viečkom a inkubujte 120 minút pri teplote 37 °C alebo inkubujte cez noc (12-18 hodín) pri teplote +2 °C až +8 °C. Absorbancia aj zaradenie sú zhodné pre oba typy inkubácií.

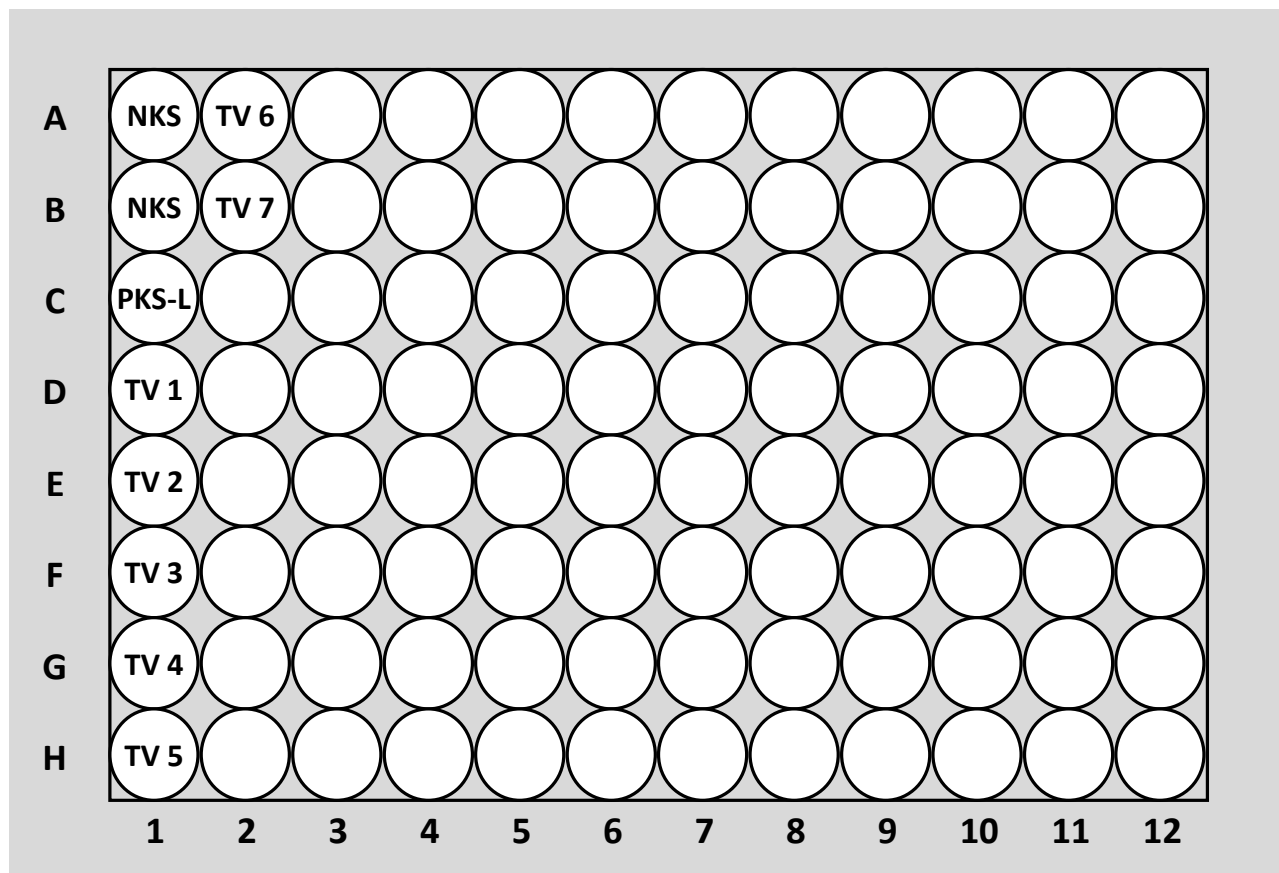
Vzorky mlieka

- Pipetujte 100 µl Negatívneho kontrolného séra do 2 jamiek (A1, B1).
 - Pipetujte 100 µl Pozitívneho kontrolného séra limitného do 1 jamky (C1).
 - Pipetujte 100 µl odtučneného mlieka do zvyšných jamiek (D1 – H12).
 - Obsah jamiek dôkladne premiešajte (najlepšie pomocou trepačky mikrotitračných platničiek).
 - Platničku prikryte viečkom a inkubujte cez noc (12-18 hodín) pri teplote +2 °C až +8 °C.
2. Odsajte obsah jamiek a 4-krát premyte pracovným premývacím roztokom. Jamky plňte po horný okraj. Na záver dôkladne vyklepte zvyšky roztoku do nasiakavého materiálu.
 3. Do všetkých jamiek nadávkujte 100 µl konjugátu.
 4. Platničku prikryte viečkom a inkubujte 60 minút pri laboratórnej teplote.
 5. Odsajte obsah jamiek a 4-krát premyte pracovným premývacím roztokom. Jamky plňte po horný okraj. Na záver dôkladne vyklepte zvyšky roztoku do nasiakavého materiálu.
 6. Do všetkých jamiek nadávkujte 100 µl jednozložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečistenie – pozri kapitolu Technické pripomienky.

7. Platničku prikryte viečkom a inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote v tme. Pozorne sledujte vývoj modrého sfarbenia, najmä v jamkách s pozitívnym kontrolným sérom.
8. Reakciu zastavte pridaním 100 µl Zastavovacieho roztoku v rovnakom poradí a intervaloch, ako sa dávkoval substrát.
9. 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.

9 Pracovná schéma



Vyšetrenie séra

NKS 100 μ l riedeného

PKS-L 100 μ l riedeného

TV 1-x 100 μ l riedeného testovaného séra

Vyšetrenie mlieka

NKS 100 μ l

PKS-L 100 μ l

TV 1-x 100 μ l testovanej vzorky mlieka

10 Validita testu

Test je platný, ak:

Absorbancia Negatívneho kontrolného séra je väčšia ako 0,750.

$$\boxed{\text{NCS}} > 0,750$$

Absorbancia Pozitívneho kontrolného séra limitného je menšia ako 0,3-násobok absorbancie negatívneho kontrolného séra.

$$\boxed{\text{PCS-L}} < 0,3 \times \boxed{\text{NCS}}$$

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

11 Hodnotenie výsledkov

Výpočet percenta blokácie

Vydeľte rozdiel priemernej absorbancie Negatívneho kontrolného séra (NKS) a absorbancie vyšetrovanej vzorky priemernou absorbanciou Negatívneho kontrolného séra (NKS).

$$\text{Percento blokácie} = \frac{(\text{Priemerná absorbancia NKS} - \text{Absorbancia vzorky})}{\text{Priemerná absorbancia NKS}} \times 100 [\%]$$

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

Tabuľka 1 Interpretácie výsledkov vyšetrení

Percento blokácie [%]	Hodnotenie
menší ako 45	negatívny
45-50	hraničný
väčší ako 50	pozitívny

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

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.

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

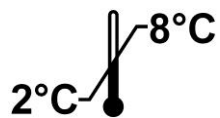
- nedostatočné premiešanie roztokov a vzoriek pred použitím
- zámena uzáverov fľaštičiek
- použitie rovnakej špičky pri pipetovaní rôznych roztokov
- vystavenie reagensí nadmernej teplote, bakteriálnej alebo chemickej kontaminácii
- nedostatočné premytie jamiek, neplnenie jamiek až po okraj, nesprávne 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 analyzátoru.

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 IBR-gB ELISA(192)

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Sérum alebo plazma: Dávkovanie Riediaceho roztoku vzorie 50 μ l Mlieko: Dávkovanie Riediaceho roztoku vzoriek 0 μ l
2		Sérum alebo plazma: Dávkovanie kontrolných sér 50 μ l Mlieko: Dávkovanie kontrolných sér 100 μ l
3		Sérum alebo plazma: Dávkovanie vzoriek 50 μ l Mlieko: Dávkovanie vzoriek 100 μ l
4		Inkubácia Sérum alebo plazma: <ul style="list-style-type: none"> • 120 minút pri teplote 37 °C • cez noc (12-18 hodín) pri teplote +2 °C až +8 °C Mlieko: <ul style="list-style-type: none"> • cez noc (12-18 hodín) pri teplote +2 °C až +8 °C
5		Odsatie a premytie jamiek 4-krát
6		Dávkovanie Konjugátu 100 μ l
7		Inkubácia 60 minút pri laboratórnej teplote
8		Odsatie a premytie jamiek 4-krát
9		Dávkovanie substrátu (TMB-Complete) 100 μ l
10		Inkubácia 15 minút pri laboratórnej teplote.
11		Dávkovanie Zastavovacieho roztoku 100 μ l
12		Fotometrické meranie pri vlnovej dĺžke 450 nm