

TestLine
Clinical
Diagnostics



Návod na použitie

AD Ab ELISA

REF AD0480



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

Imunoenzymatická súprava na stanovenie protilátok proti vírusu Aujeszkyho choroby ošípaných v krvnom sére alebo mäse

1 Úvod

Aujeszkyho choroba (Aujeszky's disease AD) je infekčné ochorenie ošípaných. Pôvodcom je prasací herpetický vírus typu 1 (SHV-1) z čeľade Herpesviridae. Ochorenie sa vyznačuje dvojfázovým priebehom, na akútne štádium infekcie nadväzuje latentná fáza. V prípade postihnutých ošípaných dochádza v akútnom štádiu k poruchám nervového systému a dýchacieho ústrojenstva. Pri malých prasatách má ochorenie spravidla fatálny priebeh. Ošípaná, ako prirodzený hostiteľ a rezervoár vírusu, je v čase latentného štádia infekcie šíriteľom vírusu pre ostatné vnímavé zvieratá, pre ktoré je ochorenie obvykle smrteľné.

Diagnostika ochorenia je založená na detekcii protilátok proti vírusu Aujeszkyho choroby (AD) v krvnom sére a svalovej tekutine ošípaných. Súprava je vhodná na preukázanie infekcie v chovoch, na kontrolu účinnosti ochrannej vakcinácie aj pri certifikácii infekcie bežných stád.

Súprava AD Ab ELISA deteguje protilátky proti kompletnému súboru vírusových antigénov (nie je vhodná na odlíšenie infikovaných zvierat od zvierat očkovaných gE vakcínou).

Citlivosť súpravy je nastavená na Medzinárodné štandardné sérum ADV 1 s riedením v pomere 1:8.

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 prasaciemu 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 (prasací herpetický vírus typu 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 prasacie sérum neobsahujúce špecifické protilátky	1 × 0,4 ml
PCS-L	Pozitívne kontrolné sérum limitné 20-krát koncentrované prasacie sérum obsahujúce špecifické protilátky	1 × 0,4 ml
CONJUGATE	Konjugát 100-krát koncentrované kozie alebo králičie protilátky proti prasaciemu imunoglobulínu značené peroxidázou	1 × 0,8 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 × 70 ml
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 vyšetrovaní 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 (24 mesiacov od dátumu výroby). Po otvorení sa odporúča súpravu spotrebovať do 3 mesiacov. Súprava nesmie zmraznúť!

Vzorky a ich skladovanie

Ako vzorka na vyšetrenie sa môže použiť sérum alebo svalová tekutina mäsa. Vyšetrované 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.

Riediaci roztok vzoriek je v pracovnej koncentrácii, ďalej neriediť!

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

Konjugát riedte v pomere 1:100 Riediacim roztokom konjugátu. Napr. 600 µl Konjugátu doplňte Riediacim roztokom konjugátu do celkového objemu 60 ml (na jednu platničku: 120 µl do 12 ml, pre jeden strip: 10 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 a príprava vzoriek a kontrolných sér

Riediacci roztok vzoriek pred použitím šetrne premiešajte.

Riedenie vzoriek sér a kontrolných sér

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

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

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

Príprava a riedenie vzoriek mäsa

Na vyšetrenie vzoriek mäsa sa používa svalová tekutina pripravená nasledujúcimi postupmi:

- Zmrazením a rozmrazením vzorky mäsa. Tekutinu uvoľnenú z mäsa po rozmrazení a kompresii použite na testovanie s riedením v pomere 1:5.
- Napr. 40 µl tekutiny + 160 µl Riediaceho roztoku vzoriek.
- Vykonávajte priamo v jamkách mikrotitračnej platničky (pozri kapitolu Pracovný postup). Dobre premiešajte.
- Vzorku čerstvého masa nakrájajte na drobné kúsky, doplňte pufrovaným fyziologickým roztokom (1ml/1g svaloviny) a pridaním morského piesku homogenizujte v trecej miske. Homogenát preneste do skúmavky, centrifugujte 10 minút (3000 ot./min.), získaný supernatant použite na vyšetrenie s riedením v pomere 1:5.
- Napr. 40 µl supernatantu + 160 µl Riediaceho roztoku vzoriek.
- Vykonávajte priamo v jamkách mikrotitračnej platničky (pozri kapitolu Pracovný postup). Dobre premiešajte.

Zriedené vzorky je nutné vyšetriť čo najskôr.

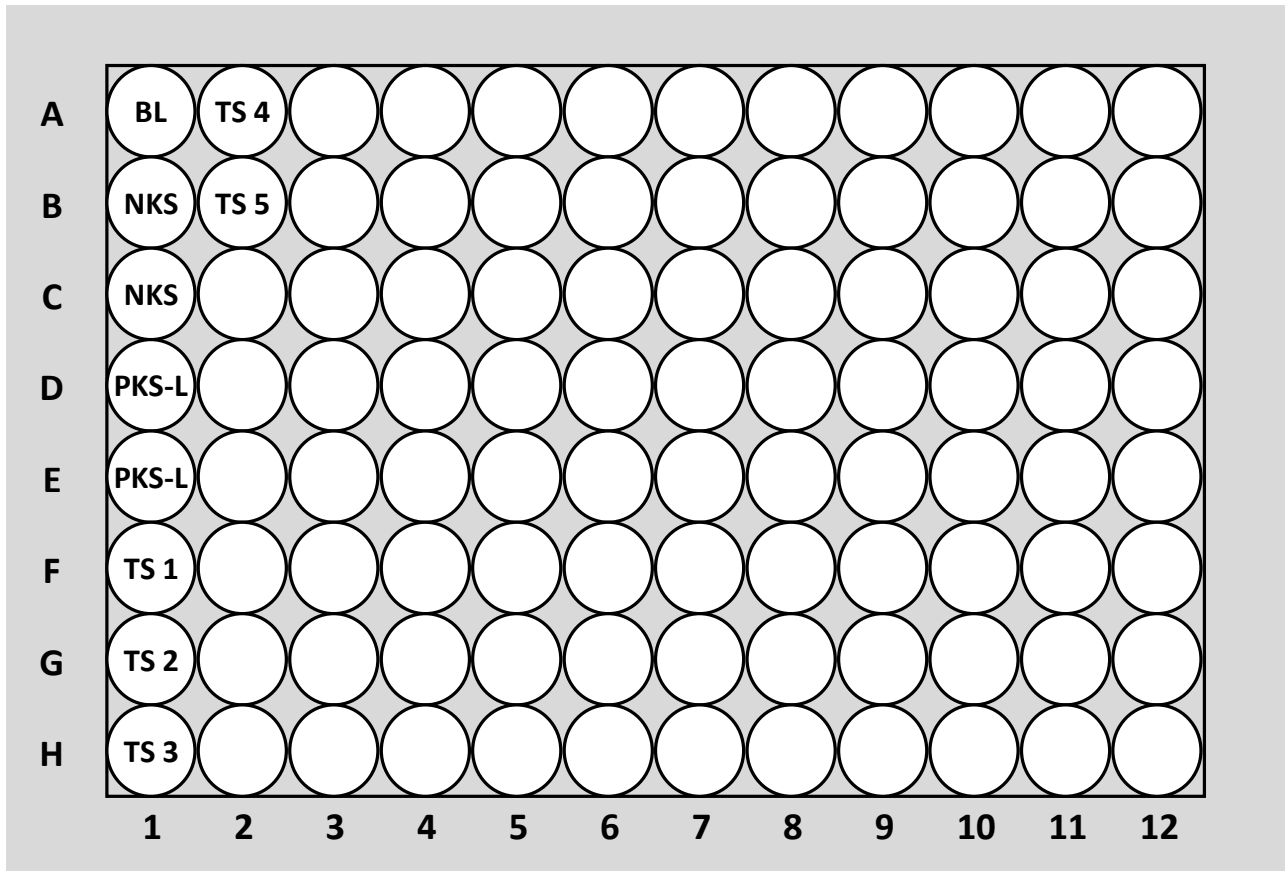
8 Pracovný postup

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 dávajte podľa pracovnej schémy.
 - 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).
2. Platničku prikryte viečkom a inkubujte 30 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.
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 µl 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



BL 200 μ l Riediaceho roztoku vzoriek (Blank)

NKS 200 μ l riedeného NCS

PKS-L 200 μ l riedeného PCS-L

TS 1-x 200 μ l riedeného testovaného séra

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.

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

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

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

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:

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

Interpretácie výsledkov vyšetrení sú uvedené v tabuľke (Tabuľka 1)

Tabuľka 1 Interpretácie výsledkov vyšetrení

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

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

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:

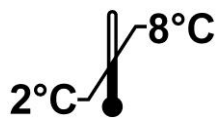
- nedostatočné premiešanie roztokov a vzoriek pred použitím
- zámena uzáverov fľaštičiek
- použitie rovnakej špičky pri pipetovaní rôznych roztokov
- vystavenie reagensí nadmernej teplote, bakteriálnej alebo chemickej kontaminácii
- nedostatočné premytie jamiek, neplnenie jamiek až po okraj, nesprávne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














Správna výrobná prax

Poznámky

Poznámky

Poznámky

Schéma testu AD Ab ELISA

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Dávkovanie Riediaceho roztoku vzoriek Blank 200 μ l Ďalšie jamky 190 μ l
2		Dávkovanie neriedených kontrolných sér a vzoriek 10 μ l Okrem blank
3		Inkubácia 30 minút pri teplote 37 °C
4		Odsatie a premytie jamiek 4-krát
5		Dávkovanie Konjugátu 100 μ l Vrátane blanku
6		Inkubácia 30 minút pri teplote 37 °C
7		Odsatie a premytie jamiek 4-krát
8		Dávkovanie substrátu (TMB-Complete) 100 μ l Vrátane blanku
9		Inkubácia 15 minút pri laboratórnej teplote.
10		Dávkovanie Zastavovacieho roztoku 100 μ l Vrátane blanku
11		Fotometrické meranie pri vlnovej dĺžke 450 nm