**Serologická diagnostika Enzootické bovinní leukózy metodou blocking ELISA**

index senzitivity – směs 10 vzorků séra

960 reakcí

**ELISA Bovinní leukóza sérum sreening**

Verze: P02140/02

**Návod k použití**

Výrobce Výhradní zástupce v České a Slovenské republice

****

**O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.** Bořetická, 193 00 Praha 9 Česká republika info@oks.cz

[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz/)

**O.K. SERVIS BioPro SK, s.r.o.** Bulharská 70, 821 04 Bratislava Slovenská republika bratislava@oks.cz [www.biopro.cz](http://www.biopro.cz/)

Obsah

1. [ÚVOD 3](#_TOC_250022)
2. [PRINCIP TESTU 3](#_TOC_250021)
3. [OBSAH DODÁVANÉ SOUPRAVY A SKLADOVÁNÍ REAGENCIÍ 4](#_TOC_250020)
4. [BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ 5](#_TOC_250019)
5. [POŽADOVANÝ MATERIÁL NUTNÝ K VYŠETŘENÍ, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY 5](#_TOC_250018)
6. [NÁVOD K POUŽITÍ 5](#_TOC_250017)
	1. [PŘÍPRAVA PROMÝVACÍHO ROZTOKU 5](#_TOC_250016)
	2. [NANÁŠENÍ SÉRA 6](#_TOC_250015)
	3. [VYMÝVÁNÍ 7](#_TOC_250014)
	4. [NANESENÍ KONJUGÁTU 7](#_TOC_250013)
	5. [VYMÝVÁNÍ 7](#_TOC_250012)
	6. [ODHALENÍ 8](#_TOC_250011)
	7. [ČTENÍ 8](#_TOC_250010)
7. [VALIDAČNÍ KRITÉRIA 9](#_TOC_250009)
8. [INTERPRETACE 9](#_TOC_250008)
9. [SHRNUTÍ 9](#_TOC_250007)
10. [LIKVIDACE SOUPRAVY 9](#_TOC_250006)
	1. [OPATŘENÍ PŘI NÁHODNÉM ÚNIKU 9](#_TOC_250005)
	2. [VLASTNÍ LIKVIDACE DIAGNOSTICKÉ SOUPRAVY 10](#_TOC_250004)
	3. [ZPŮSOB ZNEŠKODNĚNÍ KONTAMINOVANÉHO OBALU 10](#_TOC_250003)

[DODATEK – KONTAKTY 11](#_TOC_250002)

[VÝROBCE 11](#_TOC_250001)

[VÝHRADNÍ ZÁSTUPCE V ČR A SR 11](#_TOC_250000)

1. Úvod

Enzootická bovinní leukóza je infekční lymfoproliferativní onemocnění skotu které je rozšířené na celém světě. Onemocnění je způsobené exogenním C-typem retroviru, viru Enzootické bovinní leukózy, která je odpovědný za perzistentní infekci v sub-populacích B lymfocytů integrací virového DNA do mnoha míst buněčné DNA.

Většina infikovaného skotu zůstává po celý život zdravá, ačkoliv u přibližně 30% nakažených se rozvíjí perzistentní lymfocytóza u malé skupiny (do 10%) se rozvinou tumory mízních uzlin.

K onemocnění je vnímavý hlavně stáda na produkci mléka a onemocnění se šíří převážně horizontálním přenosem při kontaktu s krví nebo sekrety obsahujícími infikované lymfocyty.

Žádná léčba ani vakcinace není dostupná, eradikace je založená na eliminaci infikovaných zvířat, která se hledají hlavně detekcí specifických antivirových protilátek, hlavně virových proteinů z raných stadií infekce.

Detekce protilátek založená zpočátku na Imunodifusní technice na agarovém gelu ( AGID) pro detekci protilátek proti povrchovému glykoproteidu gP51 byla v minulosti široce používána. Ale citlivost AGID testu je omezena a byly hlášeny případy, kdy selhala u zvířat produkce odpovědných protilátek. Z tohoto důvodu je v současnosti prováděn screening metodou ELISA, která je mnohem jednodušší, rychlejší a citlivější.

Princip této soupravy je založen na kompetici mezi BLV protilátkami z bovinního séra a protilátkami peroxidáza- konjugát monoklonální anti-gP51. gP 51 je hlavním povrchovým glykoproteinem, který je dobře zachován z BLV.

Tato souprava umožňuje detekci specifických protilátek zaměřených proti antigenu gP51 z BLV jak z individuálních vzorků séra, tak ze směsi 10 sér.

Je to důležitý nástroj jako doplněk dalších nepřímých ELISA k diagnostice BLV, které používá ultračištěný BLV lysát.

1. Princip testu

Princip tohoto testu je založen na:

1. Všechny jamky polystyrénových mikrodestiček jsou potaženy virovým antigenem ( BLV )
2. Testovaná séra jsou ředěna a inkubována v jamkách. Specifické protilátky proti antigenu gP 51 BVL přítomné v séru pak vytvoří imunokomplex gP51– který efektivně maskuje stranu gP51.
3. Po vymytí je anti-gP51 monoklonální protilátka navázaná na enzym. Následuje inkubace v jamkách. V přítomnosti specifických protilátek
4. Po vymytí je ke konjugátu přidán enzymový substrát (TMB) a vytvoří se modrá směs, která se po blokování stane žlutou. Intenzita zabarvení se měří a značí úroveň protilátek přítomných ve vzorku.

Cut-off hranice je stanovena pomocí kontrolního séra, které je dodávané se soupravou (pozitivní kontrola) a umožňuje detekci zředěného Evropského standardního séra E 4 - 1/100 v negativním bovinní séru. Tato pozitivní kontrola musí být přidána na každou mikrodestičku.

Tato souprava bez kontrolních jamek je zvláště vhodná pro screening skotu smícháním 10 individuálních vzorků séra. Každá destička dovoluje screening z 94 x 10 = 940 zvířat. Směsné vzorky, které jsou shledány pozitivní, musí být sérologicky vyšetřeny individuálně.

1. Obsah dodávané soupravy a skladování reagencií

Je doporučeno pracovat se všemi komponenty při + 21°C ( 5 °C) tudíž všechny reagencie musí být přeneseny do pokojové teploty nejméně 1 hod před začátkem testování ( kromě konjugátu a vzorků kontrol).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  **Složka** **Monojamkové potažené mikrodestičky** |  **Množství** 10 |  **Skladovací podmínky a poznámky** +5 °C ( 3 °C)* Jestliže není celá mikrodestička použita najednou, může být uskladněna pro pozdější použití, jestliže je ihned uzavřena do vzduchotěsné nádoby a skladována při + 5 °C ( 3 °C).
 |
| **Koncentrovaný vymývací roztok**(20 x) | 3 x 100 ml lahvičky | +5° C ( 3 °C)* Mohou se vytvářet krystaly při +5 °C ( 3 °C), které se rychle rozpustí při + 21 °C ( 5 °C). Jemné promíchává- ní roztoku urychlí rozpuštění krystalů.
* Roztok může být také skladován při + 21 °C ( 5 °C) po dobu 1 měsíce, jestliže bude lahvička dobře uzavřena, aby byla připravena ihned k použití.
* Koncentrovaný (20 x) vymývací roztok se používá stejný pro všechny soupravy z INSTITUT POUQUIER a může být použit stejně u rozdílných diagnostických souprav.
* Vymývací roztok může být po zředění skladován 3 dny při +5 °C ( 3 °C).
 |
| **Ředící roztok 1***Nebeská modř* | 3 x 120 ml lahvičky | +5 °C ( 3 °C) |
| **Pozitivní kontrola****Negativní kontrola** | 1 x 2 ml lahvička1 x 2 ml lahvička | +5 °C ( 3 °C) |
| **Monoklonální anti gP51 / peroxidáza konjugát** | 1 x 1,5 ml lahvička | +5 °C ( 3 °C)* Zředěný konjugát nemůže být skladován.
 |
| **Odhalovací roztok 2**Připravený k použití (TMB) | 1 x 120 ml lahvička | +5 °C ( 3 °C) |
| **Stop roztok**0,5 M kyselina sírová | 1 x 120 ml lahvička | +5 °C ( 3 °C)* Může být skladována při 21 °C ( 5 °C) po dobu 1 měsíce (pokud je lahvička dobře uzavřena ve vzduchotěsném prostoru), aby byla připravena ihned k použití.
* Používá se stejný pro všechny soupravy INSTITUT POURQUIER a může být tedy použit adekvátně i u jiných diagnostických souprav.
 |
| Návod k použití |  |  |

1. Bezpečnostní opatření
2. Při práci s reagencii nevkládejte pipety do úst
3. Vyhněte se kontaktu se substrátem (TMB\*) s kůží, sliznicemi a očima.
4. „Stop - roztok“ obsahuje 0,5 M kyselinu sírovou\*, která může při kontaktu způsobit vážné popálení kůže, sliznic a očí !!!
5. Materiál v testovací soupravě neobsahuje žádné infekční složky a bovinní séra jsou teoreticky také neinfekční, přesto je doporučeno před úplnou likvidací dekontaminace všech destiček i použitých elementů, které přišly do jakéhokoliv kontaktu se vzorky a reagencii ponořit na minimálně 1 hodinu do čerstvě připraveného 5% roztoku sodium hypochloridu **nebo** autoklávovat při 120 °C min po dobu 1 hod.

*\* Toxický produkt – je k dostání v Institut Pourquier*

1. Požadovaný materiál nutný k vyšetření, který není součástí soupravy
2. Spektrofotometr pro mikrodestičky
3. Centrifuga
4. Centrifugační zkumavky a mikrozkumavky
5. Vortex nebo podobný typ třepačky
6. Vymývací systém pro mikrodestičky, aby bylo dávkováno 300 l do každé jamky
7. Přesné mikropipety a multidávkovací mikropipety (požadovaná přesnost musí být ≤ 10 % pro objemy nižší nebo rovno 10 l a 5% pro všechny ostatní požadované objemy)
8. Jednorázové špičky na pipety
9. Destilovaná voda: voda používaná pro rozpuštění "hemolyzového pufru" a „koncentrovaného vymývacího roztoku“ může být vyráběna tradičním destilačním systémem nebo jiným vysokovýkonným čistícím systémem pro vodu (reverzní osmóza, čištění na pryskyřici nebo přes aktivní dřevěné uhlí)
10. Víčka na mikrodestičky (víčko, hliníková nebo adhesivní folie)
11. Návod k použití
	1. Příprava promývacího roztoku

Rozřeďte ampulku "koncentrovaného vymývacího roztoku ( X20 )" v 1900 ml destilované vody. **Roztok se dále nazývá „ promývací roztok“.** Rozředění může být provedeno před odstraněním krystalků, které se mohou objevit při +5 °C ( 3 °C) a které při teplotě + 21°C (± 5°C) samovolně vymizí a to za předpokladu, že bude celá 100 ml ampulka použita najednou.

* 1. Nanášení séra

Kontroly a vzorky ( individuální a směsné vzorky sér) jsou zředěny na ½ použitím následující metody:

* + - Rozplňte 50 l promývacího roztoku do jamky
		- Rozplňte:
			* 50 l neředěného pozitivního kontrolního séra do A1
			* 50 l neředěného negativního kontrolního séra do B1 a C1(viz poznámky 2 a 3)
* Rozplňte podle tabulky 1 do každé jamky 50 l každého vzorku (séra nebo směsi sér), který je testován (každý testovaný vzorek do jedné jamky),
* Homogenizujte obsah jamek jemným třepáním destiček (viz pozn. 1),
* Zakryjte destičku (víčkem, hliníkovou nebo adhesivní folií)
* Ponechejte inkubovat po dobu **30 min ( 3 min) při 21°C (  5 °C).**

*tabulka 1 - rozdělení sér na mikrodestičku*

A B C D E F G H

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| P | 6 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| N | **..** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| N |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

N = negativní kontrola

P = pozitivní kontrola

1 = testovaný vzorek č. 1

2 = testovaný vzorek č. 2

3 = …………………

Poznámky:

1. *Jednotlivé plnění 96 jamek je někdy dlouhý proces. Aby se dodržel standardní čas inkubace, jsou kontroly a vyšetřované vzorky připravovány v destičkách s 96 jamkami s U – tvarem dna jamek. Proto je možné je přenést rychle (sloupec za sloupcem) pomocí multi-kanálové pipety. Nicméně je však nezbytné ředit vzorky stejným způsobem jako kontroly.*
2. *Umístění kontrolního séra v A1, B1 není důležité. Mohou být rozmístěny kdekoliv na destičce. Může být lepší přidat opakování kontrol na stejnou destičku, aby se stanovila průměrná prahová hodnota.*
3. *Aby mohla být reakce zkontrolována, může být také použit Evropský standard ( E4/10) zředěný 1/10 v negativním séru.*

*4. Laboratoře, které používají automatické metody nebo ty které preferují předředění séra, aby se zvýšila opakovatelnost, nemusí mít dostatek reagencií (např. „koncentrovaný vymývací roztok (20 x)).*

*Činidla navíc mohou být dodána zdarma na požádání.*

* 1. Vymývání
1. Vyprázdněte obsah destičky poklepáním manuálně nebo lépe pomocí automatické metody.
2. Naplňte všechny jamky na destičce s promývacím roztokem, pak je znovu vyprázdněte.
3. Opakujte krok 3. dvakrát (celkově 3 vymytí).

Poznámky:

*Když pracujete s několika destičkami současně je možné (aby se synchronizovaly všechny kroky) zanechat destičky plné „ promývacího roztoku“. Po dobu jedné hodiny se validita výsledků nezmění.*

* 1. Nanesení konjugátu
1. Rozřeďte konjugát 1/100 v „promývacím roztoku“.
2. Rozplňte 100 l ředěného konjugátu do každé jamky.
3. Přikryjte destičku (víčkem, hliníkovou nebo adhesivní folií) a ponechte inkubovat **15 minut** ( 1 min) **při +21 °C**

(  5 °C).

* 1. Vymývání
1. Prázdný obsah destičky vyprázdněte vyklepáním nebo jinou automatickou metodou.
2. Naplňte všechny jamky na destičce **promývacím roztokem** a pak je znovu vyprázdněte.
3. Opakujte **krok 2** dvakrát (celkově **3 vymytí**).

Poznámky:

1. *Zvláštní péči věnujte poslednímu vymytí. Je velmi důležité pro správný výsledek testu.*
2. *Jestliže je vymytí provedeno manuální metodou, je možné po posledním vymytí poklepat mikrodestičku o suchou osušku, aby se kompletně vyprázdnily všechny jamky.*
	1. Odhalení
3. Rozplňte 100 l „ odhalovacího roztoku č. **2** “ připraveného k použití do jamky.
4. Inkubujte destičku po dobu **10 min při +21 °C ( 5 °C)** (ve tmě).
5. Přidejte **100 l „stop roztoku“** do jamky.
6. Jemně třepte destičkou, aby se barevný roztok zhomogenizoval. Otřete opatrně spodní stranu destičky.

Poznámky:

1. *10ti minutová odhalovací perioda, která je indikována v této metodě dává O.D.hodnotu uvedenou v bodu INTERPRETACE (Optical Densities hodnota), když je tato metoda implementovaná v našich laboratořích. Nicméně stupeň barevného odhalení může být lehce pozměněna různými faktory (kvalita vymytí, kvalita použité vody, precizní pipetování, teplota při reakci…). Podle pracovních podmínek může uživatel ukončit reakci po 10 minutách ± 5 minut.*
2. *Čtení může být ukončeno do 1 hodiny po zastavení reakce, jestliže jsou destičky uchovávány ve tmě.*
	1. Čtení

Čtěte ve světelném záření o vlnové délce 450 nm (OD.450). Fotometr musí být nejprve nastaven tak, aby nedával žádný signál na prázdnou mikrodestičku (blanked on air).

Spočítejte pro každé sérum procentuální inhibici ve srovnání s negativní kontrolou. Tato hodnota se získá následujícím způsobem:

**OD 450 analyzovaného séra**

**--------------------------------------------------------------------- x 100**

**průměrem OD 450 negativních kontrol**

**S/P % =**

1. Validační kritéria

Výsledek může být uvážený a hodnověrný jestliže jsou splněna následující kritéria:

Negativní kontrola má **minimální průměrnou OD 450 hodnotu 0.800**

a

**procentuální inhibice** pozitivní kontroly je **rovna nebo nižší než 20%**.

1. Interpretace
* Vzorky (individuální séra nebo směsi sér) s **S/P %** rovnou nebo vyšším než **40 %** jsou považovány, že pochází od zvířat, které nejsou nosiči specifických protilátek proti antigenu viru BVL gP51.
* Vzorky (individuální séra nebo směsi sér) s **S/P %** nižším než **40 %** jsou považovány, že pochází od zvířat, které jsou nosiči specifických protilátek proti antigenu viru BVL
1. Shrnutí

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | interpretace | interpretace |
|  | pozitivní | negativní |
| vzorky | < 40% | ≥ 40% |

1. Likvidace soupravy
	1. Opatření při náhodném úniku

Soupravy jsou adjustovány a baleny způsobem, který neumožňuje náhodný únik kapalin ve větším rozsahu. V případě rozlití nebo netěsnosti některé lahvičky může dojít k lokálnímu úniku roztoku. V takovém případě uniklou kapalinu zasypte savým materiálem (piliny, perlit apod.) Po odsátí kapaliny odstraňte savý materiál a místo opláchněte proudem vody. Zabraňte kontaktu s kůží a očima - používejte osobní ochranné pracovní prostředky (gumové rukavice).

* 1. Vlastní likvidace diagnostické soupravy
1. Dezinfekce čerstvě připraveným 5% roztokem sodium hypochloridu po dobu 60 minut nebo
2. parní sterilizace při 120 °C po dobu min 60 minut nebo
3. spálením ve spalovně biologických odpadů.

Každé zneškodnění odpadů musí probíhat v souladu s vnitrostátní i místní legislativou resp. administrativními opatřeními.

* 1. Způsob zneškodnění kontaminovaného obalu:

Postupujte podle zákona 125/1997 Sb. o odpadech v pozdějším znění a jeho prováděcích předpisů.

Dodatek – Kontakty

Výrobce

****

Výhradní zástupce v ČR a SR



O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.

**Kanceláře**: Bořetická, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@oks.cz

**Servis**: Bořetická, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, servis@oks.cz

**Infolinka**: +420 841 111 114

[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz/)

**O.K. SERVIS BioPro SK, s.r.o.**

**Kancelář:** Bulharská 70, 821 04 Bratislava, Slovenská republika

tel.: +421 243 634 967, fax: +421 233 331 785

bratislava@oks.cz

**Servis:** tel.: +421 220 512 703